



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Evaluación y mapeo de caracteres asociados a la resistencia a
la infección por *Fusarium verticillioides* en una población de Haploides
Duplicados de Maíz (*Zea Mays*)**

Lic. Alfredo Andrés Zeballos

**TESIS FINAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL**

**Director: Dr. Daniel Presello
Co-Directora: Dra. Silvina Oviedo**

Evaluación y mapeo de caracteres asociados a la resistencia a la infección por *Fusarium verticillioides* en una población de Haploides Duplicados de Maíz (*Zea Mays*)

Alfredo Andrés Zeballos

Licenciado en Biotecnología- Universidad Nacional del Litoral

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, durante el período comprendido 2014/2015, bajo la dirección del Dr. Daniel A. Presello.

Lic. Alfredo Andrés Zeballos

Maestrando

Dr. Daniel Presello

Director

Dra. Silvina Oviedo

Co-Directora

Defendida:de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer muy especialmente al Dr. Daniel Presello por la oportunidad de realizar este trabajo. Fueron circunstancias muy especiales las que me llevaron a él, y en todo momento se mostró dispuesto a ayudarme y colaborar conmigo en todo lo posible a pesar de las dificultades. Siempre voy a estar agradecido por haber confiado en mi y por haberme ayudado a realizar mi tesis. A la Dra. Silvina Oviedo, cuya colaboración y asistencia fue fundamental para la realización de esta investigación. A ambos, por su infinita paciencia, por el tiempo dedicado a esta tesis y por sus sabias recomendaciones voy a estar siempre agradecido.

Al personal de INTA EEA Pergamino del sector Maíz que colaboraron en la realización de diferentes tareas que fueron parte de este trabajo. En especial a Mariana Fernández cuya participación y ayuda fue muy importante para la investigación.

Al Dr. Gerardo Giomi, por su ayuda en las tareas de mapeo de QTLs y en los análisis estadísticos.

A toda mi familia porque desde siempre estuvieron conmigo, apoyándome en todo momento, a su manera, pero siempre ahí.

Y por supuesto a Belen, mi esposa, quien siempre me dio su apoyo, su consejo, su caricia, su palabra, para seguir adelante. Fueron muchos momentos vividos en todo este camino, muchas cosas que pasaron. Y siempre caminamos juntos. Un eterno gracias para ella.

DEDICATORIAS

A mis viejos. Nada de todo esto hubiera sido posible sin su ejemplo.

A Belu por el aguante de siempre.

INDICE

INDICE.....	I
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	V
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. MAÍZ	1
I.1.1. Origen y generalidades	1
I.1.2. Distribución geográfica en Argentina	5
I.1.3. Importancia y economía	7
I.2. EL GÉNERO <i>FUSARIUM</i>	8
I.2.1. Generalidades	8
I.2.2. <i>Fusarium verticillioides</i>	9
I.3. MICOTOXINAS	11
I.3.1. Generalidades	11
I.3.2. Fumonisinas	15
I.4. ENFERMEDADES DE LA ESPIGA DE MAÍZ: PODREDUMBRES DE ESPIGA	15
I.4.1. Agentes causales.....	16
I.4.2. Fuentes y dispersión de inóculo	16
I.4.3. Rutas de entrada y colonización del patógeno	17
I.5. RESISTENCIA DEL HUÉSPED	18
I.5.1. Resistencia genética	19
I.5.1.1. Resistencia Nativa.....	19
I.5.1.2. Resistencia debida a la presencia de eventos transgénicos.	20
I.6. MANEJO DE PATOGÉNESIS MEDIANTE RESISTENCIA GENÉTICA	20
I.6.1. Resistencia en estigmas de maíz.....	21
I.7. POBLACIONES UTILIZADAS PARA MAPEO GENÉTICO	22
I.7.1. <i>Haploides Duplicados y mejoramiento genético vegetal</i>	22
I.8. MEJORAMIENTO GENÉTICO A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES.....	23
I.8.1. Marcadores moleculares: generalidades	23
I.8.1.1. Marcadores SNPs.....	24
I.9. CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO Y LOCALIZACIÓN DE GENES Y REGIONES CROMOSÓMICAS ASOCIADAS A CARACTERES DE INTERÉS EN PLANTAS.....	25
I.9.1. Detección de <i>QTLs</i>	25
I.9.2. <i>Best Linear Unbiased Prediction (BLUP)</i>	26
I.10. HEREDABILIDAD.....	27
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	28
II.1. HIPÓTESIS.....	28
II.2. OBJETIVOS	28

II.2.1. <i>Objetivo General</i>	28
II.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
III.1. MATERIAL GENÉTICO VEGETAL	29
III.2. AISLAMIENTO FÚNGICO	29
III.3. MARCADORES MOLECULARES.....	29
III.4. ENSAYO A CAMPO	29
III.5. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	30
III.6. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> : MEDICIÓN DE CARACTERES FENOTÍPICOS	30
III.6.1. <i>Senescencia de estigmas</i>	30
III.6.2. <i>Degradación de estigmas in vitro</i>	30
III.6.3. <i>Prueba de extracto</i>	31
III.6.4. <i>Prueba de compuestos volátiles</i>	32
III.6.5 <i>Análisis de flora nativa presente</i>	33
III.7. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE LOS DATOS FENOTÍPICOS	33
III.8. CALCULO DE HEREDABILIDAD	35
III.9. ANÁLISIS DE LOS DATOS FENOTÍPICOS PARA EL MAPEO DE QTLs	36
III.10. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO Y MAPEO DE QTLs	36
IV. RESULTADOS	37
IV.1. GENOTIPADO	37
IV.2. FENOTIPADO	37
IV.2.1. <i>Porcentaje estigmas abortados</i>	37
IV.2.2. <i>Degradación de estigmas in vitro</i>	41
IV.2.3. PRUEBA DE EXTRACTO.....	46
IV.2.4. PRUEBA DE PRESENCIA DE COMPUESTOS VOLÁTILES	47
IV.2.5. ANÁLISIS DE LA FLORA NATIVA PRESENTE.....	47
IV.3. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DE LIGAMIENTO Y MAPEO DE QTLs.....	48
IV.3.1 <i>Análisis de la segregación de marcadores polimórficos</i>	49
IV.3.2 <i>Construcción del mapa genético</i>	51
V. DISCUSIÓN	55
V.1. PORCENTAJE DE ESTIGMAS ABORTADOS	55
V.2. DEGRADACIÓN DE ESTIGMAS <i>IN VITRO</i>	57
V.3. PRUEBAS FÍSICAS/ BIOQUÍMICAS DE RESISTENCIA	59
VI. BIBLIOGRAFÍA	61

ABREVIATURAS

CIM	Mapeo por intervalo compuesto
DH	Haploides Duplicados
LOD	Proporción de máxima verosimilitud
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
QTL	Loci de carácter cuantitativo
BLUP	Mejor Predicción Lineal Insesgada

RESUMEN

Las enfermedades conocidas como podredumbres de espiga son causadas por hongos. La especie patógena más importante en la región maicera argentina es *Fusarium verticillioides*. Una de las vías principales para que este hongoinfecte la espiga es a través del estigma. *Fusarium verticillioides*, además de afectar directamente el rendimiento en grano, afecta la calidad de los mismos contaminándolos con sustancias tóxicas denominadas Fumonisinas. La resistencia genética es la mejor alternativa para el control de enfermedades de plantas. El desarrollo de híbridos con características genéticas asociadas a la resistencia a enfermedades evita la aplicación de agentes de control químico que son nocivos para el medioambiente y las personas. En investigaciones anteriores se observó que la población SPF051 presenta muy buen comportamiento frente a la infección por *Fusarium spp*, tanto en condiciones de campo como de laboratorio. El objetivo de este trabajo fue estudiar fenotípica y genotípicamente SPF051, así como dilucidar los mecanismos mediante los cuales se manifiesta la resistencia observada. Se construyó una población de DH (haploides duplicados) originada a partir del cruzamiento de SPF051 y L4674 (susceptible a la infección por *F. verticillioides*). Los parentales y los DH fueron genotipados con 384 marcadores SNP (Polimorfismo de nucleótido simple) y fenotipados para porcentaje de estigmas abortados y degradación de estigmas in vitro, caracteres reportados previamente como relacionados a la resistencia observada en SPF051. Se calculó su heredabilidad y se realizaron los procedimientos de mapeo genético sobre la población. La heredabilidad para porcentaje de estigmas abortados fue alta (h^2 : 0.92), mientras que para degradación de estigmas in vitro fue bastante baja (h^2 : 3.6E-0.5). Solo 82 SNP resultaron útiles para la investigación. El bajo porcentaje de marcadores polimórficos fue debido al alto polimorfismo en el genoma de SPF051. Se pudo obtener una señal significativa mediante un análisis de CIM (Mapeo por Intervalo Compuesto) en el cromosoma 1 con un R^2 de 0.191. Esta señal fue la que mostró un valor de LOD mayor con una contribución positiva por parte de SPF051 a la variación observada. Porcentaje de estigmas abortados es un carácter simple, fácil de medir y con una alta heredabilidad. Los estudios de mapeo genético son prometedores, aunque será necesaria una investigación más profunda que incluya más ambientes, más marcadores y más años de prueba sobre la población para tener la certeza de que es un carácter útil para un programa de mejoramiento. Los resultados obtenidos en este trabajo son una contribución inicial en el estudio de la reacción a la infección por *F. verticillioides* en SPF051.

ABSTRACT

The diseases known as ear rots are caused by fungi. *Fusarium verticillioides* is the most important pathogenic species in Argentina's main corn region. The main entrance of this fungus to infect the ear is through the silk. *Fusarium verticillioides*, in addition to directly affect grain yield, also affects grain quality contaminating them with toxic substances called Fumonisins. Genetic resistance is the best alternative for control of plant diseases. Developing hybrids with specific genetic characteristics associated to disease resistance prevents the application of chemical control agents that are harmful both to the environment and people. In previous investigations it was found that SPF051 population shows very good resistance to infection by *Fusarium spp*, under both field and laboratory conditions. The aim of this work was to study phenotypically and genotypically SPF051 to elucidate the mechanisms by which the observed resistance manifests. A mapping population of doubled haploids (DH) originated from the cross between SPF051 and L4674 (susceptible to infection by *F. verticillioides*) was built. Parental materials and DH were genotyped with 384 single nucleotide polymorphism (SNP) markers and phenotyped for percentage of aborted stigmas and in vitro degradation of stigmas, two traits that, according to previous research, seemed to be involved in ear rot resistance of SPF051. Heritabilities were calculated and genetic mapping was conducted on the population. Heritability for percentage of aborted stigmas was high (h^2 : 0.92), while for in vitro degradation of stigmas was quite low (h^2 : 3,6E-05). Only 82 SNP markers were useful for this research. The low percentage of polymorphic markers was due to the high polymorphism of SPF051 genome. Significant signal on chromosome 1 was obtained by CIM (Composite Interval Mapping) analysis with an R^2 of 0.191. This signal was the one showing the higher LOD value with a positive contribution from SPF051 to the variation observed. Percentage of aborted stigma is a simple, easy to measure and high heritability trait. Genetic mapping studies are promising, although further research will be needed with higher marker saturation and evaluations in a wider range of environments. The results obtained in this research are just an initial contribution to the study of the interaction between *F. verticillioides* and SPF051.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Maíz

I.1.1. Origen y generalidades

El maíz (*Zea mays* spp.) es una especie de gramínea anual, originaria y domesticada por los pueblos indígenas. Es un cultivo muy antiguo, de unos 7000 años de antigüedad, que se originó de una antigua forma salvaje de maíz nativo, ahora extinta, en las alturas de México o Guatemala (Weatherwax, 1955; Mangelsdorf, 1974), y fue utilizado por las civilizaciones Maya y Azteca. Asimismo, fue llevado por los colonos españoles al viejo continente en los siglos XVI y XVII, y desde ese momento el cultivo se diseminó por todo el mundo. Es generalmente aceptado el hecho de que el teosinte es el antecesor silvestre y/o allegado al maíz y que ha participado directamente en el origen del maíz cultivado moderno, a través de un proceso de mutaciones y selección natural (Longley, 1941), u obtenido por los primeros agricultores nativos americanos fitomejoradores (Beadley, 1939, 1978 y 1980).

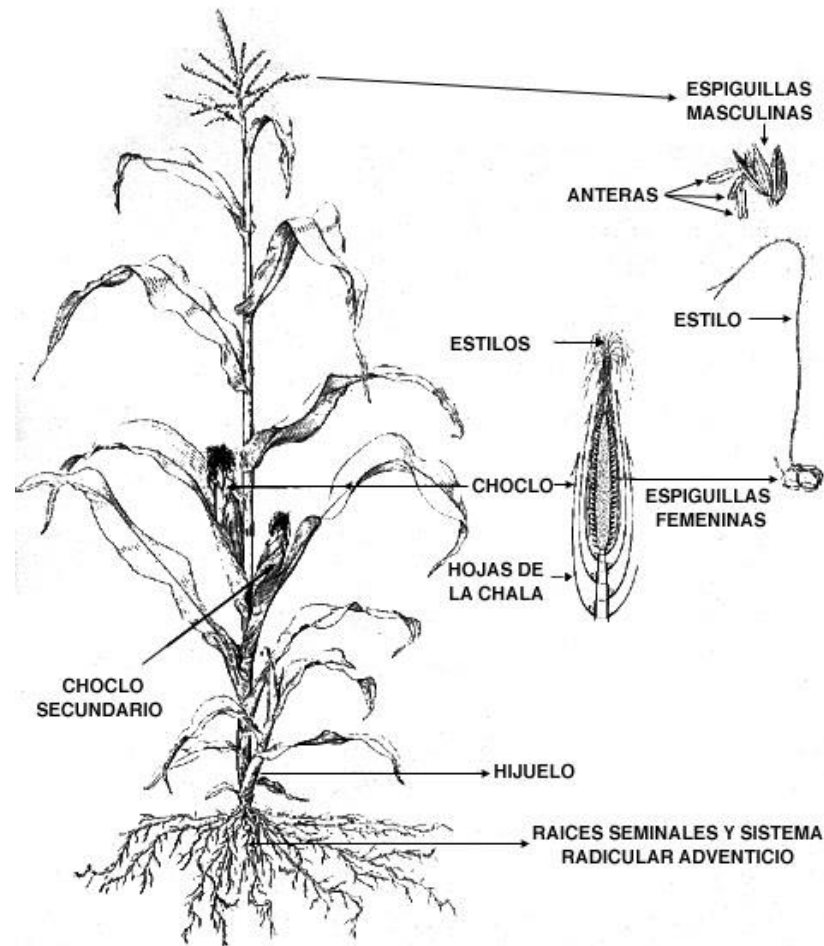
Existe bastante consenso alrededor de la idea de que el maíz es el cereal más completamente domesticado. Se ha argumentado que la moderna planta de maíz es incapaz de existir de manera salvaje, aunque aún hay una importante discusión al respecto. Las variedades modernas tienen espigas más grandes y un mayor peso y número de granos por espiga en comparación con el maíz que cultivaban las civilizaciones antiguas.

Actualmente su siembra esta difundida en todo el mundo, ya que constituye un alimento fundamental, además de constituirse en materia prima para diversos productos y procesos industriales.

Se puede definir a la planta de maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos.

La especie es de ciclo anual, con vainas foliares que se superponen y láminas alternadas. Posee espigas (inflorescencias femeninas) de 7 a 40 cm de largo y flores estaminadas que, en conjunto, forman grandes panojas terminales o inflorescencias masculinas (Figura 1). Es una

especie alógama (i.e., se propaga por semillas producidas mayormente por fecundación cruzada) que depende mayormente del movimiento del polen por el viento.



Fuente: CIBA-GEIGY (1979)

Figura 1: Esquema de planta de maíz en el momento de antesis y detalles de inflorescencias femeninas y masculinas en el momento de polinización

La planta tiene dos tipos de raíces, las primarias son fibrosas, presentando además raíces adventicias que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo; ambas tienen la misión de mantener la planta erecta; sin embargo, por su gran masa de raíces superficiales es susceptible a la sequía, además de ser intolerante a suelos deficientes en nutrientes y a la presencia de grandes vientos. El tallo está compuesto a su vez por tres capas: una epidermis exterior, impermeable y transparente; una pared por donde circulan

las sustancias alimenticias y una médula de tejido esponjoso y blanco donde se almacenan las reservas alimenticias, en especial los azúcares. Las hojas toman una forma alargada íntimamente enrollada al tallo, del cual nacen las espigas. Cada espiga consiste en un tronco o marlo que está cubierta por filas de granos cuyo número puede variar.

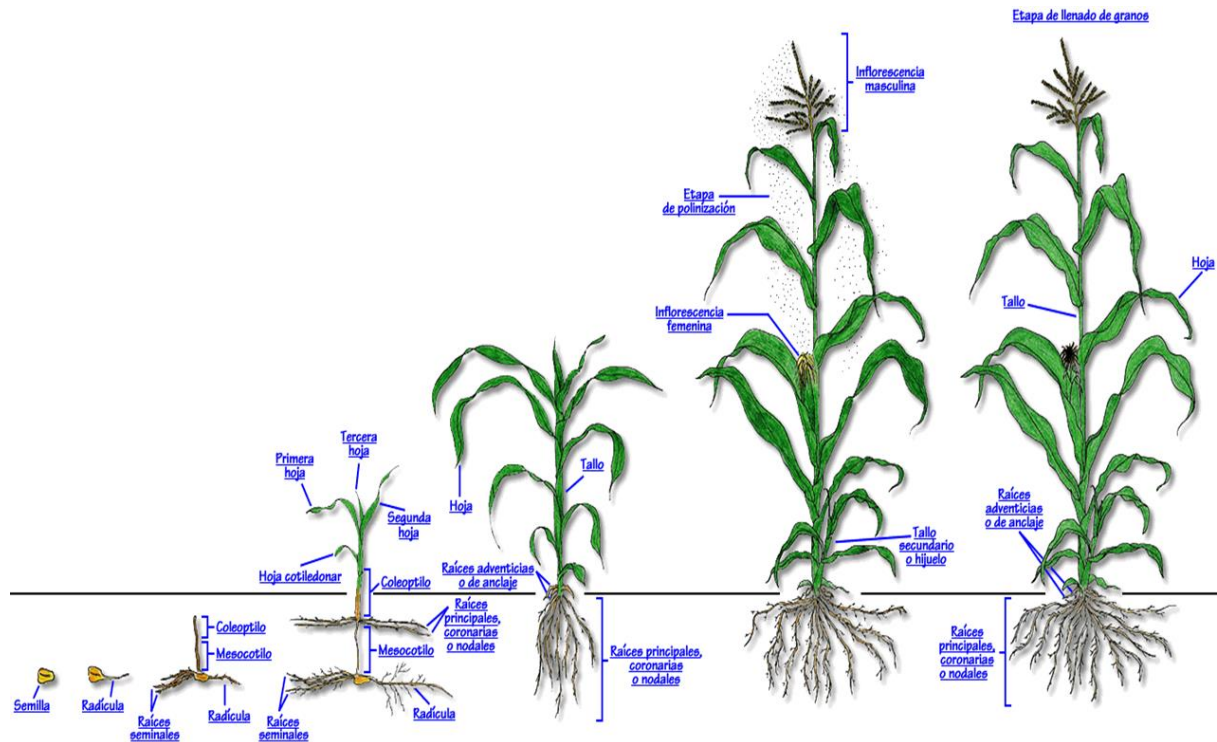
El maíz es una planta monoica de flores unisexuales; sus inflorescencias masculinas y femeninas se encuentran bien diferenciadas en la misma planta. La inflorescencia masculina es terminal, denominada panoja; está compuesta por un eje central y ramificaciones laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas, las cuales están protegidas por dos glumas, que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panoja hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen.

Las inflorescencias femeninas, denominadas espigas, se localizan en las yemas axilares de las hojas, tienen forma cilíndrica y consisten de un raquis central o marlo donde se insertan las espiguillas por pares; cada espiguilla con dos flores pistiladas, una fértil y otra abortiva; estas flores se arreglan en hileras paralelas. Las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis y un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen.

En la espiga, cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósipide que está insertado en el marlo; la cantidad de grano producido por una espiga está limitada por el número de granos por hilera y de hileras por espiga.

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. Esta fase consta de dos ciclos: en el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; es en este periodo donde la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción; en el segundo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción, y finaliza con la emisión de los estigmas. La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento del peso de las hojas y otras partes de la flor; y durante la

segunda etapa el peso de los granos aumenta con rapidez (Tanaka y Yamaguchi, 1972) (Figura 2).



Fuente: <http://www.huertocaseropr.com/2011/11/como-cultivar-maiz-en-su-huerto-casero.html>

Figura 2: Crecimiento y desarrollo de la planta de maíz.

La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción como consecuencia de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas agroecológicas concretas, desarrollando particularidades, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura, lo cual les otorga adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud.

La morfología o arquitectura de la planta también ha sido objeto de presiones de selección que han dado lugar a una gran variabilidad del número, la longitud y la anchura de las hojas, así como de la altura de las plantas, los lugares en que aparecen las espigas, el número de espigas por planta, los ciclos de maduración, los tipos de granos y el número de hileras, entre otras muchas características.

Esta variabilidad es de gran valor para mejorar la productividad de la planta y determinados elementos orgánicos del grano. Los principales componentes de rendimiento son el número y el peso de los granos, y vienen determinados por factores genéticos cuantitativos que son pasibles de selección. El número de granos está determinado por el número de hileras y el número de granos por hilera de la espiga. El tamaño y la forma del grano determinan su peso, asumiendo constantes factores como la textura y la densidad de los granos.

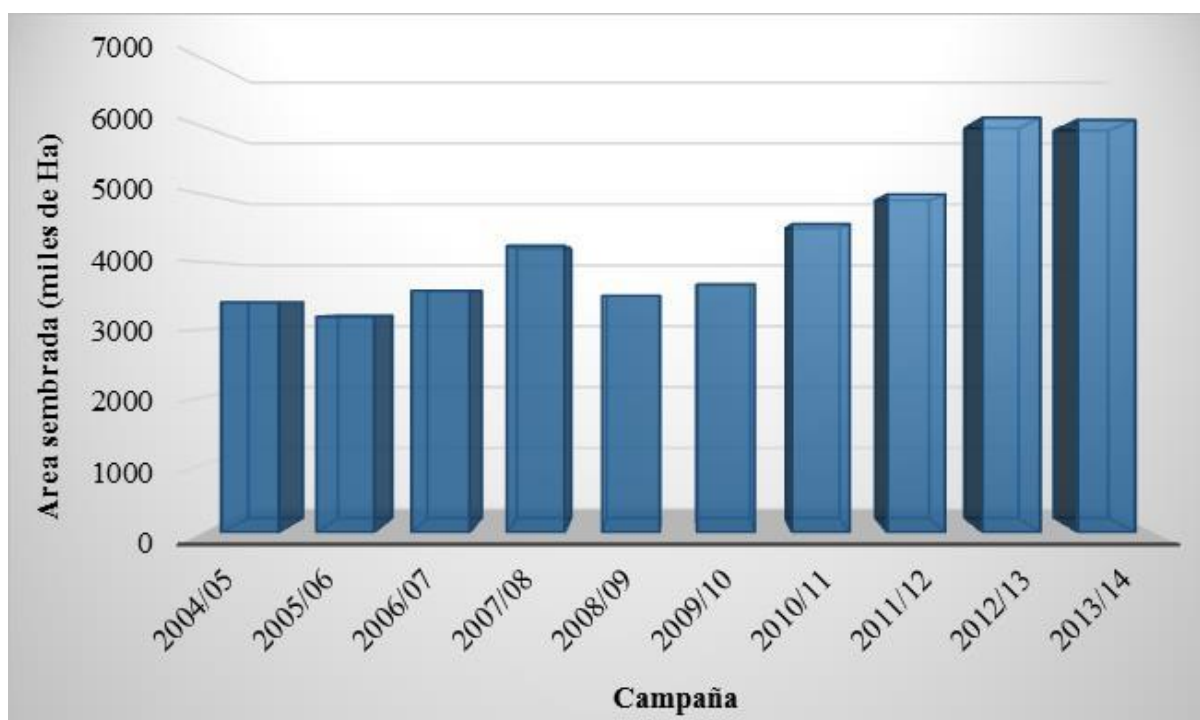
Hasta mediados del siglo 20, el maíz se fue mejorando a través del desarrollo de variedades de polinización abierta conformadas por una colección de individuos heterogéneos. Estas variedades fueron evolucionando gracias a la selección realizada primeramente por las distintas civilizaciones americanas y luego por los programas de mejoramiento. Gracias a los avances en el conocimiento de su genética, fue posible desarrollar líneas endocriadas a partir de las cuales se producen híbridos con cualidades superiores (Paliwalet *al.*, 2001).

En la actualidad se continúa con el desarrollo de híbridos de alto rendimiento y mejores características agronómicas en base a técnicas convencionales de selección y evaluación a campo, con un importante aporte de nuevas tecnologías moleculares. Los avances de la biología molecular y la ingeniería genética abren una nueva etapa en la biotecnología aplicada a la agricultura y ofrecen nuevas posibilidades para la producción de maíz. La selección asistida por marcadores moleculares acelera la incorporación de genes de interés y reduce las probabilidades de incorporar otros que no resultan deseados. La transformación genética permite acceder a nuevos genes de resistencia a insectos o herbicidas y también se esperan desarrollos futuros para modificar características más complejas de calidad o vías metabólicas relacionadas con la resistencia a diferentes tipos de estrés (Eyherabide, 2006).

I.1.2. Distribución geográfica en Argentina

Actualmente el cultivo de maíz ocupa en Argentina una amplia zona agroecológica. La región pampeana cuenta con una extensión aproximada de 9 millones de hectáreas y es conocida como una de las cinco planicies más fértiles del mundo. Dispone de excelentes condiciones climáticas, entre ellas su clima templado y sus tierras fértiles, que le permiten obtener dos cosechas por año en algunas áreas. La producción se centra sobre todo en las

provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, que juntas constituyen la «Zona núcleo». Esta zona concentra el 70% de la superficie total de maíz sembrado en el país, y contribuye con el 77% de la producción nacional (Figura 3). Además, como el principal destino del maíz argentino es la exportación, la producción se concentra principalmente en aquellas provincias que están más cerca de los puertos para evitar costos de fletes (Maizar, 2013). El resto de las provincias donde se produce maíz se encuentran agrupadas en lo que se conoce como «Zona marginal», en la cual se vienen verificando una serie de factores que están beneficiando la producción de maíz en esta zona, lo que se refleja en los aumentos de área en provincias como Santiago del Estero, San Luis, Salta y Corrientes, entre otros. Uno de los factores que dio lugar a estos cambios es el uso de nuevas tecnologías aplicadas (mejores semillas) que permitieron la expansión de la superficie hacia zonas más frías, menos fértiles y más secas; comenzando a desarrollarse así tecnologías específicas para estas zonas.



Fuente: MAGyP (2015)

Figura 3: Evolución del área total sembrada de maíz en Argentina en miles de hectáreas. Se muestra la evolución del área sembrada entre las campañas 2004/05 y 2013/14 para todas las regiones agrícolas argentinas

I.1.3. Importancia y economía

La importancia del maíz como producto destinado a cubrir necesidades alimenticias en todo el mundo genera el desafío de aumentar la producción del cultivo, ante una creciente población mundial y la reducción del área destinada a la siembra. Son muchos los aspectos que se investigan para desarrollar el cultivo con éxito, además de tratar de superar los valores de rendimiento a través del tiempo. Los logros más importantes se han obtenido con el mejoramiento genético, la utilización de nuevas técnicas de manejo del cultivo, la explotación de nuevas zonas de producción y el mejoramiento de la calidad del producto.

El uso principal del maíz es alimentario. Para las culturas latinoamericanas, los productos a base de masa de maíz sustituyen al pan de trigo. Sin embargo, el destino principal de la producción de maíz no es el consumo humano sino la alimentación de ganado, principalmente bovino y porcino, aunque también es básico en la producción de aceite comestible y hasta de etanol.

El maíz suministra elementos nutritivos y manufacturas a los seres humanos. Además, es un insumo clave para una gran cantidad de industrias que abarcan desde la alimentación humana y el forraje para las producciones de carne o leche, hasta su procesamiento industrial en plantas de alta complejidad cuyo producto final puede ser un alimento, un combustible o una materia prima para elaborar productos químicos como los biomateriales.

A nivel mundial el consumo de maíz, tanto forrajero como industrial, viene incrementándose aceleradamente, destacando entre las principales razones el rápido crecimiento de la industria de biocombustibles, la evolución de los países asiáticos (principalmente China e India), la recuperación de la industria aviar, los nuevos mercados, el aumento de la población y los mejores niveles de vida, entre otras, creciendo así el consumo mundial de maíz el cual paso de 621.6 millones de toneladas en 2001 a 863.6 millones de toneladas en 2011 (incremento del 40%).

Japón es el primer importador mundial de maíz con 15.2 millones de toneladas importadas en 2011; con cantidades menores le siguen México (9.4 millones de toneladas) y República de Corea (7.7 millones de toneladas).

Entre los principales exportadores, EE.UU. lidera ampliamente el ranking y en segundo lugar actualmente se encuentra Brasil (lugar que históricamente correspondió Argentina). Tercero se encuentra nuestro país, seguida por Ucrania, Rusia y la Unión Europea.

La oferta de maíz en Argentina se genera a partir de un área sembrada comercial de 3.7 millones de hectáreas a la que hay que añadirle aproximadamente 1.3 millones de hectáreas que se consumen en los propios establecimientos sin ingresar al circuito comercial. Del total producido se consume internamente alrededor del 40%, principalmente demandado por el sector industrial; en muy pocos casos, por ejemplo, en las comunidades de pueblos originarios, el maíz es consumido por la unidad familiar. Hay casos de autoconsumo como forraje para animales que pueden ser para producción de leche, carne vacuna, porcina y aviar, entre otros animales. El país exporta en promedio el 60% de su producción, y esta importante oferta posiciona a la Argentina como el 5to productor mundial de maíz.

Las ventas al exterior de maíz, cebada, trigo duro, sorgo granífero y harina de trigo suman 23351 millones de dólares. Esto significa que el campo argentino, sus granos y la industrialización de los mismos aportan hoy el 41% de las exportaciones totales de la República Argentina.

Finalmente, la cadena del maíz argentino transita un proceso de cambio, puesto que se está incrementando aceleradamente la demanda nacional de alimentos balanceados por el sector pecuario (bovino, porcino y aviar), dado el mayor consumo de sus sub-productos (ej.: carnes, leche y derivados lácteos); así como también el consumo de los productos de las moliendas (húmeda y seca) y de los biocombustibles.

I.2. El género *Fusarium*

I.2.1. Generalidades

Fusarium es un género que pertenece a la Clase *Hyphomycetes*, en la actualidad considerado como anamorfo asociado con el orden *Hypocreales* (*Ascomycetes*). Los estados sexuales de muchas de las especies más importantes pertenecen al género *Gibberella*, mientras que otras tienen sus estados teleomórficos en el género *Nectria* (Alexopoulos, 2001).

Las especies pertenecientes a este género están distribuidas mundialmente y es común encontrarlas en regiones tropicales y templadas, aunque también es posible aislarlas en el

desierto, en regiones alpinas y áreas árticas donde prevalecen condiciones adversas (Nelson *et al.*, 1992). Se pueden encontrar como saprófitos de suelo, en vegetales en descomposición, como patógenos de insectos, parásitos de plantas, produciendo podredumbre de frutos, marchitamiento y tizones y son causantes de enfermedades en humanos y animales vertebrados, produciendo micosis, micotoxicosis y posiblemente alergias.

Debido a esto y a la gran capacidad de adaptación a diferentes nichos, las especies de *Fusarium* son consideradas como los patógenos de plantas más importantes del mundo.

Aunque son muchas las especies que integran este género, un número limitado es responsable de la producción de la mayoría de las micotoxinas que pueden contaminar diferentes cereales y otros productos agrícolas utilizados para la alimentación humana y animal. Dentro del género existen especies como *F. graminearum*, considerado como el mayor productor de deoxinivalenol (DON), y también, capaz de producir zearalenona (ZEA). Otras especies como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son responsables de la producción de fumonisinas (Glenn, 2007).

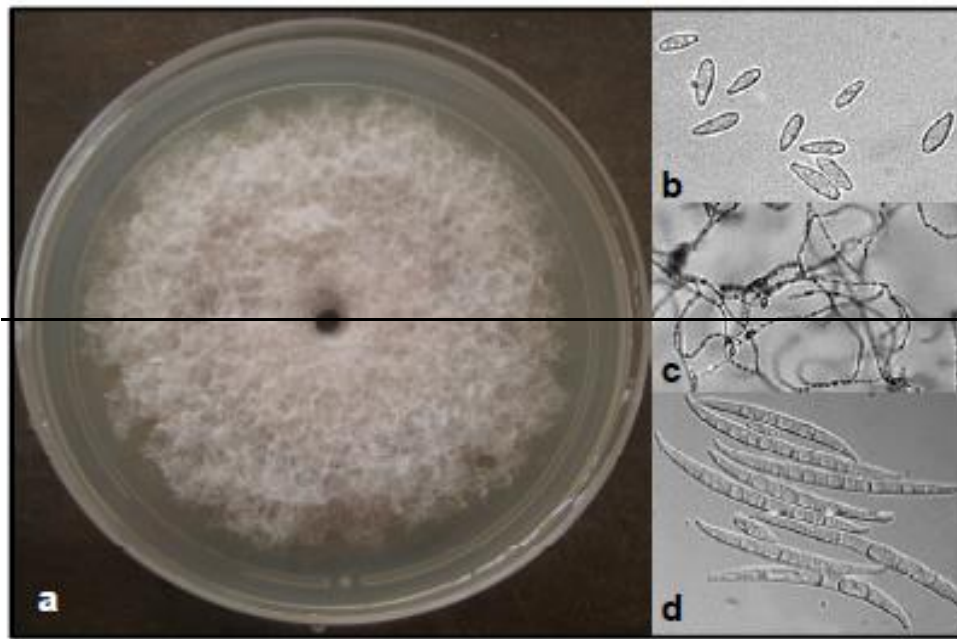
I.2.2. *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides es uno de los patógenos fúngicos más relevantes, causales de las podredumbres de espiga en maíz (Munkvold, 2003), y productor de fumonisinas. Es un ascomiceto perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que agrupa aquellos hongos para los que no hay descrita una fase sexual o bien ésta es muy rara.

Las características y morfología de la colonia de esta especie varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa glucosado (APG) el micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta, y cuando el cultivo envejece conforman estructuras llamadas esclerocios (Figura 4). *Fusarium verticillioides* infecta al maíz en todas las etapas de su desarrollo, causando podredumbres de espiga en períodos pre y post-cosecha (Munkvold y Desjardins, 1997). La infección se produce vía estigmas o heridas en granos en desarrollo y es afectada por las condiciones ambientales (Martínez *et al.*, 2010a).

El inóculo predominante en la infección de la planta son los microconidios (White, 1999). Estos son llevados hacia la espiga por el viento o insectos vectores, donde germinan y colonizan estigmas y granos. Esta especie también puede invadir sistémicamente los granos

a partir de otros tejidos de la planta. La infección sistémica puede iniciarse por conidios o micelio que se encuentran dentro o en la superficie de las semillas. El hongo se desarrolla dentro de la planta joven, pasando de las raíces al tallo y finalmente distribuyéndose en granos individuales o en ciertas áreas de la espiga. Si bien el crecimiento sistémico del hongo puede contribuir a la infección de las espigas, las vías más importantes de entrada son los granos dañados y los estigmas (Munkvold y Carlton, 1997).



Fuente: Fauguel (2012)

Figura 4: *Fusarium verticillioides* crecido sobre: (a) el medio de cultivo agar papa glucosado; (b) microconidios; (c) microconidios en cadenas; (d) macroconidios.

Los síntomas causados por *F. verticillioides* comprenden la formación de estrías blancas en el pericarpio producto de la opacidad causada por el micelio o la podredumbre total del grano. También se ha informado su presencia en granos asintomáticos (Bacon *et al.*, 1996; Munkvold *et al.*, 1997). En las infecciones asintomáticas, las hifas colonizan los espacios intercelulares, a diferencia de las infecciones sintomáticas que se encuentran tanto en los espacios intercelulares como intracelulares (Yates y Jaworski, 2000; Oren *et al.*, 2003). La infección asintomática de los granos dificulta la selección por resistencia basada en evaluaciones visuales (Duvick, 2001; Giorda y Peiretti 2006) afectando de esta manera, el desarrollo de híbridos resistentes al hongo como herramienta de prevención.

A diferencia de otros hongos que son estrictamente biótrofos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la monoliformina y las fumonisinas.

Esta especie se distribuye por todo el mundo y con alta frecuencia se aísla de maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas que varían año con año. Durante los períodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biótrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la espiga. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales. El clima caliente y húmedo favorece la pudrición de la espiga durante el período de llenado de grano.

I.3. Micotoxinas

I.3.1. Generalidades

Por definición las micotoxinas son compuestos orgánicos biológicamente activos que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas o crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, neurotóxicos e inmunosupresores (Peraica *et al.*, 1999; Richard, 2007). Actualmente se encuentra muy aceptada la idea de que el principal efecto de las micotoxinas es la capacidad de obstaculizar la respuesta inmunitaria y por consiguiente reducir la resistencia a enfermedades infecciosas. La producción de las mismas, es el resultado de la interacción entre el huésped, el ambiente y la especie toxicogénica; la interacción entre las partes interactuantes puede influenciar en mayor o menor medida la síntesis de las toxinas (Magan y Aldred, 2007).

Las intoxicaciones de los animales y el hombre asociadas con los alimentos han sido reconocidas o sospechadas durante siglos (Tabla 1). Sin embargo, la implicancia de las

micotoxinas se reconoció en 1960 con el descubrimiento de las aflatoxinas (Asplin y Carnaghan, 1961; Blount *et al.*, 1963).

Es importante destacar que la presencia de una especie toxicogénica en un alimento es, sin duda, un llamado de atención del peligro potencial de encontrar micotoxinas. Entre los sustratos más apropiados para la biosíntesis de micotoxinas se ubican los productos de origen vegetal (cereales y oleaginosas), ricos en proteínas y calorías, las cuales constituyen un aporte valioso para la dieta de gran parte de la población mundial. El crecimiento fúngico y la producción de las micotoxinas puede ocurrir en los granos en cualquier etapa de la cadena alimentaria: antes de la cosecha (en el campo), entre la cosecha y el secado, o durante el almacenamiento (Smith y Moss, 1985).

Una vez ocurrida la contaminación, estos compuestos son de difícil eliminación. Las evidencias científicas de los efectos de las micotoxinas sobre la salud han llevado a algunos mercados a establecer límites máximos de contaminación en el grano a fin de evitar la exposición de la población y las pérdidas económicas. La Unión Europea es el grupo de países con legislaciones más severas sobre inocuidad en grano, y esta tenencia se está extendiendo a otros países importadores como China, Pakistán, India, Japón, entre otros. Para acceder a estos mercados, los países exportadores deberán aplicar medidas de morigeración de la contaminación a fin de cumplir con los niveles de exigencia.

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que hasta un 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con micotoxinas cada año (Wilson *et al.*, 2001). Se ha calculado que, en los EEUU y Canadá, las pérdidas anuales debidas a los efectos de las micotoxinas en las industrias forrajeras y ganaderas son del orden de 5000 millones de dólares (Miller, 1991).

La presencia de micotoxinas en los productos vegetales ocasiona pérdidas económicas y como resultado causan una disminución en la producción y en la calidad de los granos, y reducción en la producción animal (baja convertibilidad alimentaria). A dicho efecto se debe agregar el costo que representa el diseño de programas de monitoreo y la necesidad de establecer regulaciones que determinen los niveles máximos permitidos a fin de minimizar los riesgos para la salud humana y animal. Además, se deben considerar las pérdidas económicas indirectas, las cuales, si bien son difíciles de cuantificar, son las de mayor

magnitud. Los productores reciben baja rentabilidad por rechazo de sus productos en los mercados internos y externos (FAO, 2004).

Dada la diversidad de condiciones ambientales bajo las cuales pueden proliferar los hongos, la infección fúngica y la contaminación con micotoxinas puede ocurrir en forma directa en cualquier momento dentro de la cadena de producción, transporte y manejo de los alimentos o forrajes en el cultivo (previo a la cosecha), como las zearalenonas o durante el almacenamiento como puede ocurrir en el caso de las aflatoxinas.

Es inevitable la presencia de estos microorganismos en el campo ya que sus propágulos perduran año tras año en el rastrojo en el caso de siembra directa, en el suelo o suspendidos en el aire, siendo transportados por el agua, el viento, los insectos, etc. No obstante, para que la infección tenga lugar y con ello aumenten las probabilidades del crecimiento fúngico en el campo y la posterior generación de micotoxinas, los cultivos deberán estar expuestos a condiciones ambientales extremas, tales como estrés térmico o hídrico; daños físicos producidos por granizos, insectos u otros factores bióticos; prácticas de manejo inapropiadas (fechas de siembra y de cosecha incorrectas, excesivas densidades, ineficientes controles de las malezas y de los insectos) o presentar características genéticas (susceptibilidad o resistencia) y/o morfológicas (por ejemplo: maíces con chalas que no cubren la espiga, con falta de compacidad) que le otorguen una mayor o menor protección frente a la invasión fúngica.

Las manifestaciones en el campo son estacionales y están generalmente relacionadas con la exposición a alimentos o forrajes contaminados. La estacionalidad está asociada a las condiciones climáticas ya que éstas afectan al desarrollo de los hongos

Tabla 1: Efectos tóxicos de las principales micotoxinas y alimentos implicados.

Fumonisin (B1, B2)	<i>Fusarium</i>	Neurotóxica, inmunotóxica, nefrotóxica, hepatotóxica	Maíz, trigo, soja, cebada, cerveza
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 y M1)	<i>Aspergillus</i>	Hepatotóxica, inmunotóxica, teratogénica	Maíz, arroz, cacahuete, pistachos, nueces, girasol, soja, leche y productos lácteos, especias
Tricotecenos (Deoxinivalenol, T2 y HT-2)	<i>Fusarium</i>	Necrosis cutáneas, alteraciones digestivas, hemorragias, taquicardia, inmunotóxica, hematotóxica, neurotóxica	Trigo, maíz, cebada, cerveza, centeno, avena
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Efectos estrogénicos, problemas reproductivos	Maíz, trigo, cebada, centeno, avena, cerveza
Patulina	<i>Penicilium</i>	Trastornos gastrointestinales, neurológicos, nefrotóxica, mutagénica	Manzana, jugos y sidra
Ocratoxinas (A)	<i>Aspergillus</i>	Nefrotóxica, inmunotóxica, teratogénica, mutagénica, embriotóxica, trastornos neurológicos	Trigo, cebada, centeno, avena, arroz, uvas, zumo de uvas, vino, cerveza, café, cacao, regaliz, especias, maíz

Fuente: FAO (2013)

I.3.2. Fumonisin

Las fumonisinas son un grupo de derivados policétidos, clasificados como carcinógenos potentes (IARC, 2004), producidas principalmente por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Químicamente dichas toxinas son una serie de amino- polioles de cadena larga (20 carbonos), esterificados en los carbonos 14 y 15 con dos grupos de ácidos tricarboxílicos (Figura 5). Se han identificado al menos 60 moléculas de fumonisinas distintas (Bartók *et al.*, 2006), entre las cuales las más abundantes son las del grupo B, derivadas en su mayoría de las cepas de *F. verticillioides*. Dentro de esta familia predominan las fumonisinas B1 (FB1), FB2 y FB3, donde las primeras son las que se encuentran en mayor predominancia en los granos de maíz (Munkvold y Desjardins, 1997).

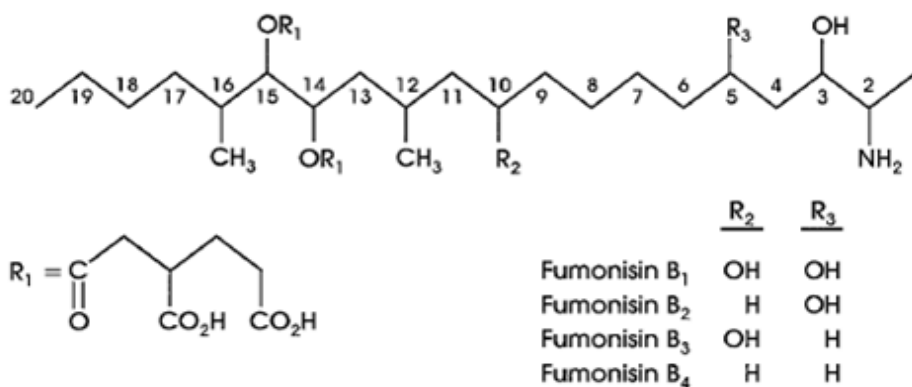


Figura 5:estructura química de las fumonisinas y detalle de las sustituciones que dan lugar a los diferentes tipos de fumonisinas conocidas.

La exposición alimentaria a estas micotoxinas produce efectos adversos en animales alimentados con granos contaminados. Son causantes del síndrome de edema pulmonar en cerdos (Harrison *et al.*, 1990), la leucoencefalomalacia en caballos (Wanget *al.*, 1992) y la apoptosis en muchos tipos de células (Jones *et al.*, 2001). Además, están asociadas al riesgo de contraer cáncer esofágico en humanos con dietas a base de maíz en China, Sudáfrica y sur de Italia (CAST, 2003).

I.4. Enfermedades de la espiga de maíz: Podredumbres de espiga

Debido a la expansión del maíz en el mundo, la incidencia de patógenos específicos del cultivo se ha incrementado en número y severidad. Las enfermedades producidas por estos

patógenos constituyen uno de los principales factores importantes que afectan el rendimiento y la calidad del producto final obtenido.

Generalmente los granos afectados presentan una menor densidad que los granos normales o en algunos casos se observa una pérdida total de los mismos con las consecuentes mermas en el rendimiento final. Si bien las podredumbres de espiga afectan la productividad del cultivo, sus consecuencias más importantes son la mala calidad física y la contaminación de los granos con micotoxinas producidas por estos hongos.

I.4.1. Agentes causales

Las enfermedades conocidas como podredumbres de espiga son causadas principalmente por hongos. Varios estudios demostraron que los géneros prevalentes son *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Diplodia* spp. Las espigas afectadas presentan proliferación de micelio que varía en color e intensidad dependiendo de los hongos que están produciendo la infección.

Fusarium verticillioides es uno de los patógenos fúngicos más relevantes, causales de las podredumbres de espiga en maíz (Munkvold, 2003), afectando el rendimiento y contaminando el grano con fumonisinas.

Se cree que este patógeno existe comúnmente en forma sistémica y asintóticamente en la mayoría de los lotes de maíz (en raíces, tejidos de tallos y granos); adicionalmente la podredumbre de los granos se asocia generalmente con tejidos dañados del huésped, por ejemplo, por la acción de insectos.

I.4.2. Fuentes y dispersión de inóculo

Como la mayoría de estos patógenos son de tipo necrótrofo, con bajo nivel de especificidad, pueden proliferar tanto en tejidos vegetales vivos como en restos orgánicos presentes en los rastrojos o en el suelo.

El ciclo de las podredumbres de espiga comienza a partir de esporas sexuales o asexuales que pasaron el invierno en cultivos invernales, principalmente cereales o restos de rastrojos. Las esporas son transportadas mediante agentes abióticos (viento, impacto de gotas de lluvia) y bióticos (insectos, pájaros) hacia la espiga de maíz donde se encuentran las dos principales vías de entrada: los estigmas y las heridas en los granos en desarrollo.

I.4.3. Rutas de entrada y colonización del patógeno

Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el cultivo de maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (Figura 6). Las principales rutas de infección son:

- ✓ Infección sistémica de las plántulas: ocurre durante y desde la germinación de la semilla, y a lo largo del establecimiento de la plántula. Como el hongo sobrevive (ya sea en la semilla o en el suelo) se encuentra estratégicamente posicionado para infectar la planta. *Fusarium verticillioides* penetra en forma directa el pericarpio y a las células de la epidermis de la raíz tres días después de que se siembran las semillas inoculadas. Las hifas colonizan las células del parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex. Entre 25 y 30 días, las raíces y el mesocótilo ya se hallan colonizados y pueden mostrar síntomas de pudrición, dependiendo de la cantidad de inóculo y de factores ambientales. En el tallo no hay muchas hifas, de ahí que la infección puede cursar de manera asintomática hasta ciertos tejidos.
- ✓ Infección de la espiga por medio del estigma: es la vía más común para que *F. verticillioides* infecte la espiga. La colonización de los estigmas ocurre con mayor intensidad luego de la polinización y puede prolongarse hasta la senescencia de los mismos según la especie patogénica. El inóculo aéreo y los conidios son transportados por el agua de lluvia y otros vectores hasta el estigma. De esa forma se facilita el acceso a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas.
- ✓ Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico: al alimentarse, varios insectos (plagas de maíz) horadan las espigas y los tallos de la planta. Este daño mecánico funciona como ruta de entrada para los conidios de *F. verticillioides*. Además, hay insectos que actúan como vectores del hongo ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos o bien trasportándolo a través de grandes distancias como el gusano de la raíz (*Diabrotica spp.*). Otros vectores descritos son el gusano elotero, los trips y los gorgojos. La función de vector se apoya en el hecho de que el hongo sobrevive en los órganos externos de los insectos mencionados.

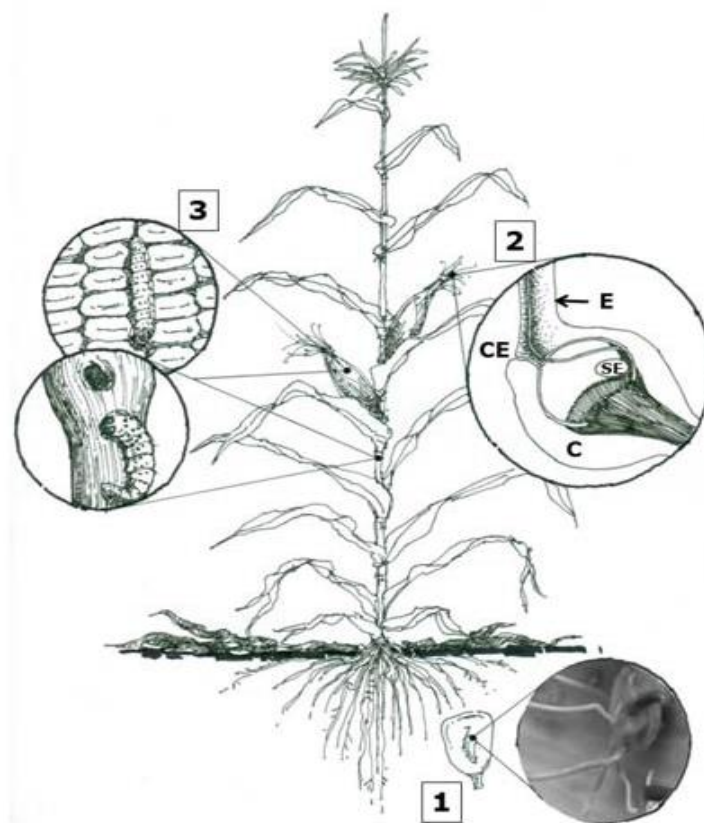


Figura 6: Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz. 1) Infección sistémica de plántulas. El hongo sobrevive en la semilla o en el suelo de donde accede a la plántula e infecta las raíces. 2) Infección a través del estigma. Los conidios del hongo son depositados en el estigma (E) y penetran a través de la parte inferior del canal estilar (CE). C: carpelo, SE: saco embrionario. 3) Infección a través de heridas. El hongo accede al tallo y/o a la espiga a través de lesiones mecánicas causadas por insectos al alimentarse.

I.5. Resistencia del huésped

La intensidad de las infecciones en maíz por *Fusarium spp.* varía de acuerdo al tipo de tejido colonizado, las barreras mecánicas, la composición química, el estado fisiológico de la planta y el nivel de daño en el tejido (Munkvold *et al.*, 1997; Dowd, 1998; Bily *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2005; Sampietro *et al.*, 2009). Aunque las plantas no cuentan con un sistema inmune de defensa, poseen otros mecanismos para protegerse de la infección por patógenos cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas poseen mecanismos constitutivos o preformados de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos.

I.5.1. Resistencia genética**I.5.1.1. Resistencia Nativa**

Se ha registrado históricamente una complicación al momento de conseguir altos niveles de resistencia genética a hongos toxicogénicos en maíz. Las carencias en este aspecto se explican por técnicas de inoculación laboriosas e inconsistentes reportadas por diferentes investigadores, las cuales rinden resultados variables dependiendo de la técnica; falta de genes de efecto mayor; falta de genotipos resistentes que actúen de manera eficiente como control, y el costo de evaluación de los resultados, en especial los niveles de micotoxinas observados. Sin embargo, se ha hecho algún progreso en cuanto a selección de híbridos durante los procesos de testeo y desarrollo de líneas. En estos procesos se pueden eliminar los genotipos muy susceptibles, de manera que los híbridos que son sembrados extensivamente no resultan demasiado afectados por la enfermedad. Aun así, es común encontrar niveles de micotoxinas a campo mayores a los aceptables.

Se han identificado fuentes de resistencia a la podredumbre de espiga producida por *Fusarium*, aunque han resultado de naturaleza poligénica, lo cual dificulta su introgresión en líneas e híbridos comerciales.

Las plantas bajo estrés son, generalmente, más susceptibles al ataque por hongos toxicogénicos, de manera que sembrando híbridos adaptados regionalmente se puede reducir el estrés abiótico y la contaminación con micotoxinas (CAST, 2003). Los híbridos sembrados fuera de su rango de adaptación suelen ser más susceptibles a la acumulación de fumonisinas. Algunas características de la espiga y del grano de ciertos híbridos podrían generar barreras físicas a la infección por *Fusarium*. Por ejemplo, los granos de ciertos híbridos resistentes tienen un pericarpio más grueso que aquellos de los híbridos susceptibles. Los híbridos con una cobertura de chala más ajustada a la espiga tienden a ser menos susceptibles a la infección por *Fusarium* (Buchaca, 2011).

En ausencia de genes de resistencia conocidos o marcadores para resistencia, mucha de la selección para bajos niveles de podredumbre de espiga y micotoxinas es el resultado de la selección para caracteres de espiga y grano que disminuyen la invasión de hongos indirectamente o físicamente, más que a través de alguna resistencia específica al patógeno.

Una de las medidas más efectivas de prevenir la proliferación de las micotoxinas es utilizar cultivares con resistencia genética a las podredumbres de espiga. El nivel de micotoxinas en grano es proporcional al nivel de síntomas visibles, de ahí la importancia de utilizar híbridos resistentes.

La susceptibilidad diferencial de los genotipos de maíz al ataque de este hongo, se conoce a nivel de cultivares inscriptos, sin embargo, es necesario establecer la variabilidad que existe dentro de cada población cuando ésta debe ser sometida al proceso de selección. Asimismo, resulta necesario establecer las posibles interrelaciones entre los diferentes grados de susceptibilidad y la variación de otros caracteres implicados. Como ejemplo de esto se tiene la cantidad de hojas que envuelven la espiga y la prolongación de las brácteas en más de 5cm de la punta de la mazorca, caracteres que han sido reportados como asociados con la prevención de la resistencia a humedad y el desarrollo de la pudrición de la mazorca.

1.5.1.2. Resistencia debida a la presencia de eventos transgénicos.

Diversos estudios se han focalizado también en la potencial resistencia transgénica contra hongos toxicogénicos y las toxinas que estos producen, aunque los resultados han sido dispares en este aspecto. De todas maneras, dada la relación entre el daño por insectos y la infección por *Fusarium*, los maíces híbridos con eventos transgénicos de protección contra insectos (maíces Bt) constituirían una herramienta en el manejo de las micotoxinas. El control de distintas especies de insectos se ha reportado desde hace tiempo como una de las causas que resultan en una reducción en la prevalencia de podredumbre de espiga en maíz (Duvick, 2001).

1.6. Manejo de patogénesis mediante resistencia genética

Ha sido difícil conseguir altos niveles de resistencia genética a los hongos causantes de la podredumbre de espiga. Las dificultades principales incluyen la falta de genes mayores que participen en la resistencia, carencia de genotipos control resistentes y el costo y la dificultad de la evaluación.

En la actualidad los esfuerzos están orientados al mapeo de caracteres cuantitativos (QTLs) y a la selección asistida por marcadores. Este enfoque ha sido difícil de implementar debido a que ningún QTL encontrado ha podido explicar más del 44% de la variación fenotípica observada (Pérez-Brito *et al.*, 2001). En general, el nivel de resistencia a *Fusarium*

en híbridos comerciales ha mejorado, pero la resistencia disponible no es adecuada para prevenir concentraciones de fumonisinas que son inaceptables para determinados fines.

La variación de la resistencia a podredumbre de espiga por *Fusarium* existe para líneas e híbridos para maíz común y para maíz dulce también. No hay evidencia de resistencia completa a podredumbre de espiga o a contaminación con fumonisinas. Pérez-Brito *et al.* (2001) demostró que la resistencia a podredumbre de espiga en dos poblaciones de maíz tropical es poligénica con relativamente baja heredabilidad. Shelby *et al.* (1994) reportaron una variación significativa entre híbridos de maíz comercial para concentración de fumonisinas, aunque ningún híbrido se encontró completamente resistente.

I.6.1. Resistencia en estigmas de maíz

La entrada a las espigas del maíz vía estigmas, canal de los estigmas o ambos, es la vía más importante de entrada de varios patógenos como las especies de *Fusarium spp.* (Kohler, 1942) Los estigmas son usualmente los primeros tejidos con el cual *F.verticillioides* entra en contacto con la planta y es razonable pensar que, en materiales resistentes, la barrera inicial a la infección estaría localizada en estos tejidos. Los estigmas de maíz contienen varios compuestos químicos, entre ellos, proteínas, vitaminas, taninos, carbohidratos y flavonoides, así como también varios compuestos volátiles.

Se ha sugerido que el componente de resistencia principal a *F. graminearum* vía estigmas podría estar en la cubierta de cera de los estigmas (Bergvinson y Reid, 1995).

La redefinición de la resistencia en componentes de mayor heredabilidad y el mapeo de esos caracteres permitiría, mediante el apilado de los mismos, facilitar el desarrollo de híbridos más resistentes.

La infección de los granos se puede lograr a partir de la inoculación de los estigmas expuestos utilizando una suspensión conidial (Headrick y Pataky, 1991). Se ha reportado una fuerte correlación entre los niveles de contaminación con fumonisinas en los granos y los factores que parecen afectar la infección vía estigmas, por ejemplo, la duración de la floración femenina o la humedad de los mismos (Maiorano *et al.*, 2009). En un detallado estudio de campo, Hesseltine y Bothast (1977) analizaron la progresión en el crecimiento de organismos en varios tejidos de la espiga en un período de 15 semanas. De sus observaciones, concluyeron que poco después de la polinización, los estigmas se vuelven tejido muerto,

funcionando como sustrato y actuando como una “autopista” hacia los granos para varios organismos. Valdivia *et al.* (2006); Stewart *et al.* (2002) y Reid *et al.* (2002) reportaron resultados de campo en los cuales observaron una podredumbre de espiga reducida, lo cual se correlacionaba con la senescencia acelerada de los estigmas e intervalos de tiempo más largos entre la emergencia de estigmas y las inoculaciones hechas al canal de estigmas.

I.7. Poblaciones utilizadas para Mapeo Genético

Para el mapeo genético de plantas, se pueden utilizar diversos tipos de poblaciones. La selección del tipo de población a utilizar se realiza en función de los objetivos de la investigación, del tiempo y de los recursos disponibles. Las poblaciones de mapeo con el mayor contenido de información son aquellas obtenidas a partir del cruzamiento entre dos individuos homocigotos contrastantes. En las plantas F1 obtenidas, el desequilibrio de ligamiento es máximo, y las poblaciones derivadas a partir de estas plantas F1 procuran explorar este desequilibrio. Para especies de autofecundación pueden utilizarse poblaciones F2, Fn, RILs (*Recombinant Inbred Lines*), derivadas de retrocruzas y haploides duplicados. Estas últimas representan la variabilidad genética entre los progenitores luego de ocurrida una sola meiosis (F1) (en algunos casos pueden ser utilizadas 2 meiosis, o poblaciones F2) y son especialmente indicadas cuando se realizan estudios de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ya que al obtenerse genotipos 100% homocigotos se dispone de poblaciones estables de mapeo, permitiendo analizar la misma población en diferentes años y localidades debido a la constante disponibilidad de semilla.

I.7.1. Haploides Duplicados y mejoramiento genético vegetal

Haploide es el individuo que posee la mitad del número cromosómico normal contenido en las células somáticas de la especie.

La producción de haploides duplicados (DH por sus siglas en inglés, “doubled haploids”) es una herramienta que permite acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento para los programas de mejoramiento tradicionales. Al carecer de genotipos heterocigotos, las poblaciones de DH necesarias para encontrar genotipos poco frecuentes pueden ser mucho menos numerosas, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes. Cuando se utilizan poblaciones DH para proyectos de mapeo genético, se

eliminan las complejidades del estado heterocigoto y se facilita enormemente el análisis genético.

I.8. Mejoramiento genético a través de marcadores moleculares

I.8.1. Marcadores moleculares: generalidades

Hace más de 90 años, Sax (1923) sugería usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas. A lo largo de la historia se han hecho intentos por seleccionar caracteres con utilidad agronómica empleando marcadores morfológicos, pero su aplicación ha sido muy limitada. Actualmente se utilizan los marcadores moleculares.

Un marcador molecular es un segmento de DNA con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o a regiones que no tengan una función conocida. En la actualidad se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo lo cual permite analizar la totalidad de la información genética (genoma) de un organismo.

Existen diferentes tipos de marcadores los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a las metodologías que se emplean para su detección:

- ✓ Basados en la hibridación del DNA (RFLP)
- ✓ Basados en la amplificación arbitraria o semi arbitraria del DNA (RAPDs, AFLPs)
- ✓ Basados en la amplificación sitio-específica del DNA (Microsatélites y sus variantes)
- ✓ Marcadores funcionales o de Expresión
- ✓ Marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

Un marcador molecular “ideal” tiene que ser polimórfico; codominante; de herencia mendeliana y no epistático; insensible ante los efectos ambientales; sin efectos visibles en el desarrollo de la planta; de fácil expresión y simple de identificar y analizar.

1.8.1.1. Marcadores SNPs

Estos marcadores se basan en la detección de polimorfismos (alteraciones alélicas estructurales en un genoma) resultantes de la alteración de una única base en una secuencia de DNA. Recientemente, gracias a las Nuevas Generaciones de Tecnologías de Secuenciación (NGST) se ha permitido evidenciar la presencia de SNPs en las más variadas especies vegetales.

Los marcadores SNP poseen naturaleza bialélica y son muy abundantes en el genoma, siendo la frecuencia de SNP de 1 cada 100-300pb para los genomas de plantas. Estos marcadores pueden encontrarse en regiones codificantes, regulatorias y no codificantes. Cuando están presentes en regiones codificantes muestran 100% de asociación con el carácter de interés, por lo que son muy útiles en Selección Asistida por Marcadores (MAS) y en el aislamiento de genes. Los marcadores moleculares se pueden utilizar en los siguientes aspectos del mejoramiento genético de plantas:

- ✓ Estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos;
- ✓ Identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas;
- ✓ Establecimiento de relaciones de parentesco entre líneas o variedades para realizar estudios genéticos;
- ✓ Localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños afectando a caracteres cuantitativos (QTLs).

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) se deben a diferencias (variación, delección o inserción) en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nitrogenada de una secuencia del genoma. Las ventajas de los SNPs son: la codominancia, la abundancia, la baja tasa de mutación y de error en el genotipado, la facilidad de analizar por métodos bioinformáticos, la alta automatización del procesamiento de la muestra y el análisis de los datos. La secuenciación a gran escala de genomas completos y de secuencias expresadas, ha permitido evidenciar la presencia de SNPs en especies como soja, girasol, arroz, maíz, cebada, trigo y caña de azúcar, entre otras (Martínez *et al.*, 2010b).

I.9. Construcción de mapas de ligamiento y localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas

La posibilidad de construir mapas de ligamiento genético en especies vegetales o animales es una de las contribuciones de mayor impacto de las técnicas de marcadores moleculares. Un mapa genético establece de manera probabilística el arreglo lineal de un grupo de marcadores (o genes) sobre el genoma de una especie. Usando este tipo de mapas es posible identificar la posición y el efecto de genes sobre caracteres de importancia mediante asociaciones estadísticas entre los valores fenotípicos y las variantes alélicas de los marcadores. La disponibilidad de mapas genéticos permite la selección indirecta de genotipos deseables, comúnmente denominada MAS mediante el seguimiento de marcadores localizados en regiones genómicas determinadas entre otras muchas aplicaciones.

I.9.1. Detección de QTLs

Los QTLs se definen como regiones cromosómicas que pueden ser identificadas a través de su asociación estadística con algún carácter medible en una población segregante (Duvick, 2001). Estas regiones representan la contribución acumulativa de uno o más genes cuyo aporte individual al fenotipo en cuestión podría ser muy pequeña para ser detectada. La disponibilidad de marcadores de ADN y poderosos métodos biométricos ha llevado a avances considerables en el mapeo de QTLs en plantas (Tanksley, 1993). La aplicación más obvia del análisis de QTLs sería la selección asistida por marcadores para mejoramiento de líneas. Sin embargo, se prevén otras áreas donde los análisis de QTLs pueden contribuir decisivamente. Estas son:

- ✓ Comprensión de caracteres complejos, como la interacción planta- patógeno;
- ✓ en genómica de plantas, la conexión de proteínas y elementos reguladores de funciones conocidas a QTLs por análisis de genes candidatos;
- ✓ la mejora de germoplasma a través de una caracterización que permita su utilización eficiente.

Caracteres tales como resistencia a podredumbre de espiga, el cual podría involucrar no más que unos pocos genes para su óptima expresión, pueden ser mapeados como un QTL utilizando grandes poblaciones segregantes. Los marcadores moleculares ligados a estos QTL

pueden proveer una ayuda al mejoramiento convencional en la introgresión de caracteres complejos durante el desarrollo de líneas.

Se han mapeado muchos QTL para podredumbre de espiga (Pérez-Brito *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008; Martin, 2011) en diferentes poblaciones de maíz. El mapeo a partir de nuevo germoplasma y en ambientes diferentes es importante para identificar nuevos QTLs y validar aquellas regiones genómicas que se piensa están implicadas en la interacción con *Fusarium*.

La búsqueda de nuevas fuentes de resistencia es un trabajo permanente en los programas de mejoramiento. Esto se lleva adelante generando nuevas poblaciones año a año mediante la utilización de parentales que presenten características favorables para el carácter en cuestión o para diferentes caracteres simultáneamente. Tales parentales pueden provenir de líneas mejoradas del mismo programa o bien de fuentes naturales externas, las cuales, además de aportar nuevos alelos de resistencia, permiten incrementar la diversidad del germoplasma disponible.

I.9.2. Best Linear Unbiased Prediction (BLUP)

En mejoramiento genético usualmente se requiere la selección de cultivares a partir del análisis de grandes bases de datos de los genotipos candidatos. La estimación de los valores genotípicos está en el núcleo de cualquier esfuerzo de “breeding”. El análisis de datos multivariados se hizo con el siguiente modelo:

$$y = X\beta + Z\mu + \varepsilon$$

donde y es el vector de observaciones, β y μ son vectores de efectos fijos y aleatorios, respectivamente. X y Z son matrices asociadas y ε es un vector aleatorio de residuos. Se asume que los efectos aleatorios se distribuyen de acuerdo a la distribución normal multivariada $MVN(\mu, V)$ con media $\mu (0, G)$ y matriz de varianza-covarianza $V (0, R)$. Los efectos fijos pueden ser estimados por BLUE (Best Linear Unbiased Estimation), mientras que los efectos aleatorios son estimados por BLUP. En la práctica, BLUE Y BLUP necesitan ser reemplazados por sus correspondientes valores empíricos, lo cual significa que los componentes de la varianza en G y R deben ser reemplazados por sus estimados, obtenidos por REML (Restricted Maximum Likelihood). Tanto BLUE y BLUP pueden ser utilizados para resolver las ecuaciones de modelos mixtos.

Usualmente en el desarrollo de nuevas variedades, los efectos genotípicos son considerados como fijos, y de este modo se convierten en parte de β en el modelo mixto. Cuando los genotipos pueden ser considerados como aleatorios, sin embargo, los efectos genotípicos se vuelven parte de la matriz μ de este modo pueden estimarse por BLUP. Como se verá más adelante, se utilizó esta técnica para obtener los datos fenotípicos de los caracteres medidos en la población y su posterior utilización en el mapeo de genes correspondiente.

I.10. Heredabilidad

La heredabilidad de un carácter métrico es una de sus propiedades más importantes. Expresa la proporción de la varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes. Aun así, el atributo más importante de la heredabilidad en el estudio genético de los caracteres cuantitativos es su papel predictivo, que expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicación del valor reproductivo. Este valor es lo que determina la influencia de un individuo en la siguiente generación. Si en un programa de mejoramiento se eligen individuos para que sean progenitores de acuerdo con sus valores fenotípicos, su éxito en cambiar las características de la población puede predecirse únicamente a partir del conocimiento del grado de correspondencia entre los valores fenotípicos y los reproductivos. Este grado de correspondencia es medido a través de la heredabilidad (Falconer, 1996). La determinación de la heredabilidad para una población permite predecir la ganancia genética en futuras generaciones en poblaciones obtenidas a partir del mismo parental resistente. Esto se constituye entonces en un objetivo primordial; la búsqueda de nuevos genes que intervienen en los mecanismos de resistencia que se observan a campo mediante técnicas convencionales o de biología molecular constituye otro de los objetivos principales para este tipo de estudio. Ambas metas permiten utilizar el/los caracteres en estudio en programas de selección asistida por marcadores e incorporar los nuevos alelos en el “pool” de genes disponibles en el germoplasma del programa de mejoramiento.

Los mejoradores son capaces de medir valores fenotípicos directamente, pero es el valor reproductivo de los individuos lo que determina su influencia en la progenie. La heredabilidad puede ser considerada entonces como la proporción de la variación observada en una progenie que es heredada. Lo importante es que, si un mejorador selecciona plantas en base a sus

valores fenotípicos para ser usados como parentales en un cruzamiento, el éxito de tal proceso en cambiar las características de la población en un sentido predeterminado depende del conocimiento del grado de correspondencia (determinación genética) entre el valor fenotípico y los valores reproductivos. La heredabilidad mide este grado de correspondencia. No mide directamente el control genético sobre un carácter, sino como este control puede variar.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

1. Existe variabilidad entre una población de DH (Doble Haploides) originada a partir de SPF051 (Resistente a la infección por *F. verticillioides*) y L4674 (susceptible a la infección por el mismo patógeno) para los siguientes caracteres:
 - a) Resistencia *in vitro* del estigma a la degradación por *F. verticillioides*;
 - b) Producción de sustancias con efecto fungicida/fungistático en los estigmas;
 - c) Velocidad de senescencia de estigmas.
2. Existe segregación transgresiva para algunos individuos respecto de estos caracteres en la población de mapeo.
3. Existen QTLs asociados a los caracteres evaluados y ligados a una serie de marcadores SNP (Single Nucleotide Polimorfism) polimórficos con que se cuenta en la actualidad.

II.2. Objetivos

II.2.1. Objetivo General

Contribuir al mejoramiento genético del maíz a través del estudio tanto fenotípico como genotípico de la población SPF051, derivada de landrace y heterocigota resistente a *F. verticillioides*, así como a la elucidación de los mecanismos mediante los cuales se manifiesta dicha resistencia.

II.2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el grado de resistencia de los estigmas a la degradación *in vitro* por *F. verticillioides* y analizar la variabilidad que se presenta entre los DH que constituyen la población de mapeo.
2. Cuantificar el efecto del extracto de estigmas en un cultivo puro de *F. verticillioides*, y establecer relaciones con la producción de compuestos fungistáticos/fungicidas.
3. Relacionar la velocidad de senescencia de estigmas a campo con los resultados observados en las pruebas *in vitro* y establecer si existe vinculación entre este carácter, los demás obtenidos y la resistencia observada en SPF051.
4. Establecer la asociación de los resultados de las pruebas fenotípicas con QTLs ligados a un número determinado de marcadores SNP polimórficos disponibles para este trabajo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Material genético vegetal

Se emplearon para esta investigación 88 familias de haploides duplicados (DH) originados a partir del cruzamiento entre SPF051 y L4674. La población SPF051 tiene grano de tipo perlita originada a partir de selección masal por resistencia a podredumbres de espiga, a partir de una variedad nativa recolectada en la provincia de Corrientes. La población L4674 es una línea pura de tipo semidentado derivada de la autofecundación del híbrido comercial AX924.

III.2. Aislamiento fúngico

Se utilizó la cepa de *F.verticillioides* P364, aislada de maíz, productora de fumonisinas y con un nivel de agresividad representativo de la población local, siguiendo la técnica desarrollada por Iglesias *et al.* (2010).

III.3. Marcadores moleculares

El genotipado fue desarrollado por Pioneer Hi-Bred International Inc. Se tomaron 10 gramos de tejido vegetal a partir de líneas F4, y posteriormente liofilizadas mediante un liofilizador Virtis 35L GPF 24DX48. Las muestras liofilizadas fueron utilizadas para realizar los procedimientos de extracción de DNA y PCR (Polimerase Chain Reaction), necesarias para obtener los marcadores. El genotipado de las líneas parentales y recombinantes fue desarrollado en una plataforma Illumina GoldenGate high throughput assay (Fan *et al.*, 2003) utilizando 768 marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) bialélicos.

III.4. Ensayo a campo

El ensayo a campo fue sembrado en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Pergamino (33°56'53"S; 60°34'01") durante la campaña 2014/15. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con dos repeticiones. Las 88 familias y los materiales parentales fueron sembradas en parcelas de dos surcos, con un distanciamiento de 0,7 metros

y a una densidad de 6 semillas por metro. Al momento de la misma se fertilizó con 210 kg de urea en la línea de siembra, 180 kg de arrancador de Nitrógeno, Fosforo y Azufre (NPS).

III.5. Obtención del material vegetal

Se etiquetaron plantas de cada parcela con la fecha de emergencia de estigmas para luego recolectar muestras de los mismos de cuatro días. Se colectaron entre cinco y siete espigas por parcela que fueron identificadas y almacenadas a cuatro grados centígrados durante un día para luego realizar las mediciones correspondientes. La obtención de los estigmas se realizó para cada espiga removiendo primeramente la cobertura de los mismos y posteriormente separando los estigmas del marlo. Una parte de los mismos fue guardada a -20 C como respaldo para el caso de que se necesitara repetir alguna determinación. El resto se procesó cortando las puntas de los mismos para eliminar la parte seca de los estigmas y se pesó el remanente para su posterior utilización en los ensayos. Todos los estigmas fueron identificados y referidos a la correspondiente familia y repetición, para el posterior tratamiento de las muestras.

III.6. Ensayos *in vitro*: medición de caracteres fenotípicos

Los ensayos *in vitro* fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Fitopatología y en el laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Centro de Biotecnología de INTA Pergamino.

III.6.1. Senescencia de estigmas

Se realizó en cada espiga una estimación visual del porcentaje de estigmas separados de la espiga debido al aborto en el extremo proximal. Los datos fueron promediados y la media fue usada como valor final de la parcela.

III.6.2. Degradación de estigmas *in vitro*

Para este ensayo, las muestras de cada espiga fueron mezcladas en forma balanceada dentro de cada parcela para luego obtener 3 fracciones de 3 gramos de material vegetal cada una. El pesado se realizó en una balanza de precisión analítica Sartorius, con una apreciación de 0.0001g. Dos de estas fracciones (Fracciones 1 y 2) fueron destinadas al experimento de

degradación de estigmas y la restante (Fracción 3) fue secada en estufa a 60°C hasta peso constante para determinar el porcentaje de materia seca de la muestra.

La Fracción 3 fue colocada en placa de Petri tarada previamente y llevada a una estufa a 60°C hasta lograr peso constante.

Las fracciones 1 y 2 fueron decontaminadas exteriormente, bajo flujo laminar, por inmersión durante 30 segundos en un vaso de precipitado conteniendo una solución de hipoclorito de sodio al 2% y luego lavadas sumergiéndolas dos veces durante 30 segundos en vasos de precipitado con agua destilada estéril. Finalmente, se procedió a dejar secar la muestra sobre papel esterilizado para este fin, para finalmente colocarla en placas de Petri estériles previamente taradas.

La Fracción 1 fue colocada en cajas de Petri estériles y luego inoculadas con una suspensión conidial de *F. verticillioides*. Esta solución se preparó a partir de placas que habían sido inoculadas con la cepa P364. Se tomó un disco con sacabocado y se lo colocó en un Erlenmeyer con agua destilada estéril. Se diluyó y agitó. Luego se sacó una fracción para conteo en cámara de Neubauer. Se repitió la operación hasta llegar a una concentración de 2×10^6 esporas por ml. Para la inoculación, se asperjaron 450 μ l de suspensión conidial mediante un aspersor manual cuyo diámetro de aspersión cubría toda la placa a fin de distribuir el inóculo uniformemente sobre el tejido vegetal. La Fracción 2 fue tratada de igual manera con la excepción de que se asperjó con agua destilada estéril en vez de inóculo.

Las placas tratadas de esta manera fueron incubadas a una temperatura constante de 25°C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El tiempo de incubación fue de 14 días. Una vez que se cumplió el tiempo establecido, se secaron las placas a 60°C durante 48hs para la posterior lectura de los resultados.

III.6.3. Prueba de extracto

Con la finalidad de probar la hipótesis planteada en trabajos anteriores (Sampietro *et al.*, 2010 y Fauguel, 2012) respecto de que la resistencia a la infección por *Fusarium* spp. se debe a la existencia de compuestos fungicidas o fungistáticos que modifican el desarrollo normal del hongo, y que están contenidos en los estigmas de las variedades resistentes, se hicieron experimentos de crecimiento fúngico sobre tejidos de estigmas de SPF051 y L4674 con integridad física alterada.

Se pesaron 3 gramos de estigmas de la fracción que había sido congelada a -20°C y se los dividió en fracciones como en la técnica anterior. Las fracciones de estigmas congelados se molieron, utilizando para ello un mortero. Posteriormente se procedió al centrifugado a una velocidad de 12000 rpm durante 10 minutos en una ultracentrífuga refrigerada Eppendorf®, con la finalidad de obtener un sobrenadante apropiado para el procedimiento de filtrado, el cual se realizó utilizando filtros estériles Sartorius® de un tamaño de poro de $0.2\text{ }\mu\text{m}$ a fin de lograr finalmente la esterilización. El eluido se colocó en tubos Eppendorf® esterilizados para tal fin. Paralelamente, se preparó y esterilizó medio agar papa glucosa (APG), el cual se distribuyó en placas de Petri estériles (en un volumen de 20 ml por placa). Posteriormente, se colocó un volumen de $500\text{ }\mu\text{l}$ mediante micropipeta de manera uniforme tratando de cubrir toda la placa y se lo dejó difundir en el agar en condiciones de temperatura ambiente durante 8 horas para luego aplicar inóculo o agua destilada de igual manera que en el experimento anterior. Se utilizaron tres concentraciones de inóculo ($2,8$, $5,6$, y $8,5 \times 10^5$ esporas / ml) a fin de encontrar la concentración más adecuada para observar diferencias entre los tratamientos. El inóculo fue aplicado en la parte central de las placas, con la finalidad de medir el progreso en el crecimiento de la colonia en centímetros por día (cm/día). Las placas con agua fueron inoculadas con los mismos volúmenes y de la misma manera que para las soluciones con hongo.

Una vez inoculadas, las placas correspondientes a los tratamientos con agua e inóculo se incubaron a 25°C con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizó la medición del diámetro de colonia observando todos los días el crecimiento de la misma para cada una de las placas. Esta medición se realizó hasta que el hongo terminó de colonizar la placa de Petri.

III.6.4. Prueba de compuestos volátiles

Se diseñó un ensayo para analizar la presencia, en los materiales parentales, de compuestos volátiles en el extracto líquido de estigmas obtenido en el apartado 1 del párrafo anterior. Para este fin se diseñó un procedimiento que incluyó la preparación de medio de cultivo APG, de la misma manera que para el apartado anterior. Si bien el proceso fue similar, se introdujo la modificación siguiente: en lugar de aplicar directamente en el medio de cultivo el extracto de estigmas de los parentales, se lo colocó, posterior a la inoculación, sobre el medio utilizando como contenedor una tapa de tubo Eppendorf® esterilizada. De esta manera

se incubaron las placas selladas con Parafilm® para permitir el intercambio gaseoso que permita el desarrollo del hongo, pero impida la contaminación y la pérdida de posibles compuestos volátiles presentes en el extracto. Las placas fueron incubadas en este caso durante 14 días para la posterior lectura de los resultados.

III.6.5 Análisis de flora nativa presente

Con la finalidad de establecer cualitativamente el tipo de flora que se encontraba presente en las muestras de estigmas traídas del campo, se incubaron estigmas y granos provenientes de 10 parcelas elegidas al azar del ensayo sembrado para este experimento. Para los estudios, se tomaron 30 g de tejido y se colocaron en un Erlenmeyer con 270 ml de medio agar papa líquido y se lo dejó reposar en agitación durante 30 minutos. De esta solución se tomaron 10 ml y se colocaron en otro recipiente con 90 ml de del mismo medio de cultivo. Nuevamente se lo dejó reposar por 30 minutos en agitación y se repitió el procedimiento una última vez tomando 1 ml y llevándolo a 10 ml finales con el mismo medio de cultivo líquido. Adicionalmente, se extrajeron 0.1 ml de cada una de las fracciones anteriores y se inocularon placas de Petri con medio APG. Cada una de estas diluciones se incubó por duplicado para poder observar el crecimiento de las colonias de microorganismos presentes en la muestra. Las diluciones se realizaron para establecer cuál es la mejor dilución a la cual se pueden leer los resultados (número y forma de las colonias obtenidas).

Para los estudios en grano, se cosecharon espigas con aproximadamente 20% de humedad y los granos se incubaron en medio APG de la misma manera que en el experimento anterior a fin de permitir el crecimiento de microorganismos presentes en grano.

El análisis de la microflora se hizo mediante observación directa de la forma, color y aspecto de las colonias presentes en las placas de Petri dispuestas para tal fin. La medición se realizó de la misma manera tanto para los estigmas como para los granos provenientes del campo.

III.7. Análisis y procesamiento de los datos fenotípicos

Se realizó un análisis de la varianza univariado (ANOVA) para los ensayos utilizando el siguiente modelo estadístico general:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = valor observado para el carácter en el i-ésimo genotipo y la j-ésima repetición.

μ = media general

α_i = efecto del i-ésimo genotipo

ε_{ij} = error experimental

Para realizar los ANOVA se utilizó Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016) en su plataforma asociada a R. El procedimiento de análisis de la varianza tiene determinados supuestos, los cuales deben comprobarse para asegurar la validez del modelo postulado:

- Normalidad
- Homogeneidad de Varianzas
- Independencia de los datos.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados se analizaron los datos de manera de comprobar estos supuestos. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene para probar los supuestos de normalidad, de distribución de errores y homogeneidad de variancias.

Para el caso del carácter degradación de estigmas *in vitro* se utilizó la transformación Box – Cox (Tabla 2). El procedimiento para esta transformación es diseñado para determinar una transformación óptima para Y mientras se estima un modelo de regresión lineal. Es muy útil cuando la variabilidad de Y cambia como una función de X. Una apropiada transformación de Y estabiliza la variabilidad y produce que las desviaciones alrededor del modelo sean más normalmente distribuidas.

La clase de transformaciones consideradas son transformaciones de potencia definidas por:

$$Y' = (Y + \lambda_2)^{\lambda_1}$$

en la cual los datos son calculados en una potencia de λ_1 después de cambiarlo a una cierta cantidad λ_2 . Posteriormente, el parámetro de cambio λ_2 se fija igual a 0. Esta clase incluye

raíces cuadradas, logaritmos, recíprocos, y otras transformaciones comunes, que dependen sobre una potencia. Estas transformaciones incluyen:

Tabla 2: Operaciones más comunes derivadas de la transformación Box- Cox

$\lambda_1 = 2$	$Y' = Y^2$	Cuadrado
$\lambda_1 = 1$	$Y' = Y$	Datos sin Transformar
$\lambda_1 = 0.5$	$Y' = \sqrt{Y}$	Raíz Cuadrada
$\lambda_1 = 0.333$	$Y' = \sqrt[3]{Y}$	Raíz Cubica
$\lambda_1 = 0$	$Y' = \ln(Y)$	Logaritmo
$\lambda_1 = -0.5$	$Y' = 1/\sqrt{Y}$	Inversa Raíz Cuadrada
$\lambda_1 = -1$	$Y' = 1/Y$	Recíproco

El software Minitab 17 permite calcular el λ óptimo para los datos utilizados de manera de optimizar la normalización de los datos. Para los datos de degradación de estigmas *in vitro* el mejor parámetro encontrado fue $\lambda = 1.45$. Se utilizó la transformación de potencia utilizando este valor de λ y los valores se ajustaron al cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

III.8. Calculo de heredabilidad

Se calculó la heredabilidad en sentido amplio para porcentaje de estigmas abortados y degradación de estigmas *in vitro* mediante la ecuación:

$$h^2 = \sigma_g / \sigma_p$$

σ_g = Varianciadebida a factores genéticos

σ_p = Variancia fenotípica total

Los valores de σ_g y σ_p fueron estimados a partir de las esperanzas de cuadrados medios del análisis de varianza.

III.9. Análisis de los datos fenotípicos para el mapeo de QTLs

El análisis de los datos fenotípicos para la construcción del mapa de ligamiento y el análisis de QTLs se realizó utilizando también el software INFOSTAT utilizando su plataforma asociada a R. Con un análisis de la varianza multivariado (MANOVA) se obtuvieron los BLUPs (Best Linear Unbiased Predictions) y se utilizaron estos datos para la obtención de los mapas de ligamiento y el análisis de QTLs.

III.10. Construcción del Mapa de Ligamiento y mapeo de QTLs

Se utilizó el programa MapDisto 1.7.7.0.1.1 (Lorieux, 2012) para analizar los datos de marcadores moleculares. Los procedimientos que se realizaron utilizando este programa incluyen el análisis de segregación, el ordenamiento de los marcadores en los cromosomas y la construcción del mapa de ligamiento.

Para el mapeo de QTLs se utilizó el programa QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2004), a partir de la combinación de los datos surgidos del análisis de marcadores moleculares con los datos fenotípicos obtenidos en los ensayos descriptos anteriormente.

Los órdenes de los locus de marcadores y las frecuencias de recombinación utilizando Mapdisto versión 1.7 (Lorieux, 2012). Las frecuencias de recombinación en cM mediante la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1943). La distorsión de la segregación para cada locus fue testada utilizando test chi-cuadrado.

Para la detección de QTLs en caracteres individuales se utilizó el método de mapeo por intervalo compuesto (CIM) en el programa Cartographer. Se consideró un análisis de regresión “stepwise”. El umbral para declarar significativo un QTL individual fue LOD=2.5.

IV. RESULTADOS

IV.1. Genotipado

Del total de marcadores SNP analizados se identificaron 82 marcadores polimórficos. El bajo porcentaje de polimorfismo (21.4%) se debe en parte al alto grado de variabilidad, propio de las variedades de polinización abierta como lo es SPF051, lo cual dificultó la identificación de variantes polimórficas respecto a L4674. Por lo tanto, el nivel de saturación de marcadores fue bajo, especialmente en algunas regiones genómicas (Tabla 3).

Se identificaron en promedio 7 marcadores polimórficos por cromosoma, siendo los cromosomas 1 y 10 los que más marcadores polimórficos exhibieron (15 y 12 respectivamente) mientras que en el cromosoma 5 se encontró la menor cantidad de marcadores de este tipo, solamente 3.

IV.2. Fenotipado

IV.2.1. Porcentaje estigmas abortados

En trabajos llevados a cabo dentro del programa de mejoramiento de maíz de INTA Pergamino (García *et al.*, 2014), se pudo observar que al cuarto día posterior a la floración femenina de SPF051 los estigmas están casi en un 100% de senescencia (se observan separados del grano en desarrollo y comenzando a secarse) a diferencia de lo que ocurre con L4674 cuyos estigmas se encuentran comenzando el proceso de senescencia (5-10%). Dado que estos son los parentales de la población de mapeo y que porcentaje de estigmas abortados es en este caso el carácter contrastante entre ambos, la identificación del momento preciso de muestreo fue una determinación importante que permitió establecer diferencias entre los genotipos de la población.

El coeficiente de variación para los datos fue de 19.3%, y el R^2 obtenido es de 0.96 (Tabla 3). La precisión del ensayo fue suficientemente alta como para identificar diferencias significativas en los tratamientos para el nivel de significancia analizado (Tabla 4).

Tabla 3: Coeficiente de variación y ajuste del modelo para un análisis de variancia en la población de mapeo de maíz utilizada en este trabajo.

Porcentaje de estigmas abortados	164	0,96	0,92	19,3
---	-----	------	------	------

Tabla 4: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para porcentaje de estigmas abortados.

Modelo.	135926,74	82	1657,64	24,11	<0,0001
Genotipo	135915,91	81	1677,97	24,40	<0,0001
Repetición	10,83	1	10,83	0,16	0,6925
Error	5569,57	81	68,76		
Total	141496,31	163			

* Valores de $p > 0.05$ no representan diferencias significativas.

Como se observa en la Figura 7, y a partir del cuadro de ANOVA, existen diferencias significativas entre los genotipos para porcentaje de estigmas abortados. Se indican los intervalos donde se encuentran los parentales de la población de mapeo. En el gráfico se encuentran representados los intervalos de frecuencia de los genotipos para el carácter. Las barras indican la cantidad de genotipos que componen cada uno de los intervalos. En la parte inferior de las mismas se encuentra el valor promedio del carácter para el grupo de genotipos considerado. Las barras están ubicadas de menor a mayor valor de porcentaje de estigmas abortados. Como se observa, el valor para el parental L4674 se encuentra en el intervalo con un valor promedio para el carácter de 36.43% de estigmas abortados, mientras que el parental SPF051 se encuentra en el intervalo con un valor promedio de 91.73%,

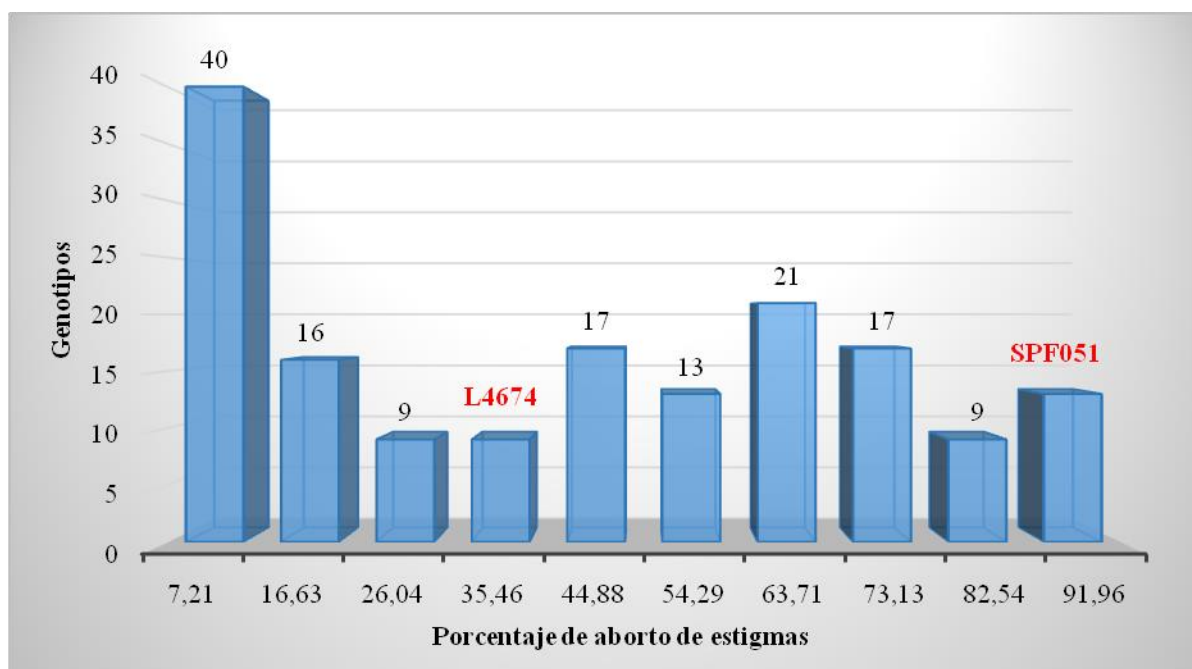


Figura 7: distribución de frecuencias de 88 haploides duplicados y las líneas parentales de la población derivada de ellos en función del porcentaje de estigmas abortados. En el eje de abscisas se indican las medias del porcentaje de estigmas abortados de los intervalos de frecuencias analizados y en las ordenadas, el número de genotipos que componen cada uno de los intervalos. Se indican los intervalos en los que se encuentran contenidos los parentales de la población en estudio.

Como se puede observar, no existen segregantes transgresivos para este carácter que sean superiores en valor a SPF051 mientras que si existen genotipos que tienen un valor menor al de L4674. Se encontraron 26 genotipos con valores de porcentaje de estigmas abortados significativamente diferentes (para el nivel de significancia analizado) y menores al valor del parental de menor valor (Tabla 5).

La presencia de segregantes transgresivos para valores menores de porcentaje de estigmas abortados en la población de haploides duplicados sería indicativa de la presencia de genes aportados por SPF051 que favorecen esta característica y que sumarían su efecto a los presentes en el parental L4674. Por el contrario, que no haya genotipos con valores mayores al parental de mayor valor para este carácter, indica que la contribución de L4674 al aumento en el porcentaje estigmas abortados, en esta población de mapeo, sería prácticamente nula.

Tabla 5: Extracto del análisis de la varianza para porcentaje de estigmas abortados para los genotipos con valores menores a L4674. Se resaltan en amarillo los genotipos significativamente diferentes ($p < 0.05$) al parental de menor valor.

L4674	35,72							G	H	I	J	K	L	M
INTA002	33,13						F	G	H	I	J	K	L	
INTA091	32,09				E	F	G	H	I	J	K			
INTA094b	30			D	E	F	G	H	I	J	K			
INTA111	28,13		C	D	E	F	G	H	I	J				
INTA072	27,5	B	C	D	E	F	G	H	I					
INTA138	26,67	B	C	D	E	F	G	H	I					
INTA084	20	A	B	C	D	E	F	G	H					
INTA083	19,59	A	B	C	D	E	F	G	H					
INTA104	19,25	A	B	C	D	E	F	G						
INTA099	18,75	A	B	C	D	E	F							
INTA063	16,31	A	B	C	D	E								
INTA089	15,5	A	B	C	D									
INTA059	15	A	B	C	D									
INTA022	13,75	A	B	C	D									
INTA124	13,25	A	B	C										
INTA026	12,5	A	B	C										
INTA092b	12,5	A	B	C										
INTA037	11,25	A	B											
INTA065	9,59	A												
INTA107	8,84	A												
INTA123	8,75	A												
INTA134	8,34	A												
INTA117	7,5	A												
INTA031	6,75	A												
INTA035	6,25	A												
INTA071	6,25	A												
INTA096	6,25	A												
INTA106	6	A												
INTA032	5,84	A												
INTA039	5	A												
INTA103	5	A												
INTA132	5	A												
INTA146	5	A												
INTA075	4,59	A												
INTA102	4,17	A												

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La heredabilidad para porcentaje de estigmas abortados obtenida en base a los resultados del análisis de variancia de este ensayo fue de 0.92, el cual es un valor que indica que el carácter es altamente heredable.

IV.2.2. Degradación de estigmas *in vitro*

La degradación de los estigmas *in vitro* fue un procedimiento que se planteó con la finalidad de establecer diferencias en la respuesta del tejido de los estigmas de la población de mapeo a la infección por *F.verticillioides*.

En el parental susceptible, el tratamiento inoculado produjo una mayor degradación de tejido en comparación a la del testigo inoculado con agua (Figura 8) mientras que en el parental moderadamente resistente, las diferencias son menores (Figura 9) con escaso desarrollo de micelio en el tratamiento inoculado.

Fusarium verticillioides es un hongo con capacidad necrotrófica y tiene la habilidad de invadir estigmas en senescencia. La alta velocidad de senescencia de los estigmas de SPF051 respecto de su contraparte L4674 podría ser un factor que afecte el desarrollo de micelio en el parental moderadamente resistente. Sin embargo, los resultados permitieron detectar diferencias importantes entre ambos parentales.

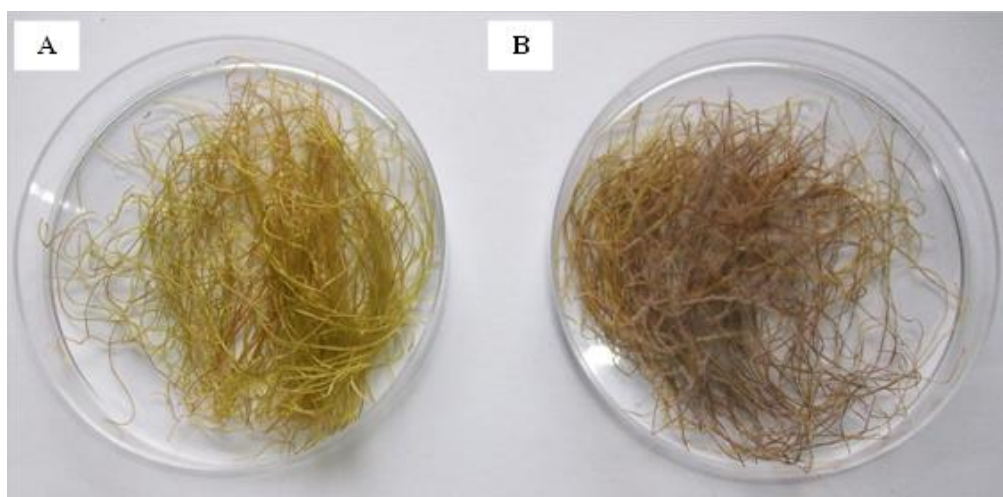


Figura 8: degradación de estigmas *in vitro* en la población L4674. El tratamiento inoculado con agua no muestra signos de infección (A), mientras que el tratamiento inoculado *Fusarium verticillioides* muestra desarrollo de micelio.

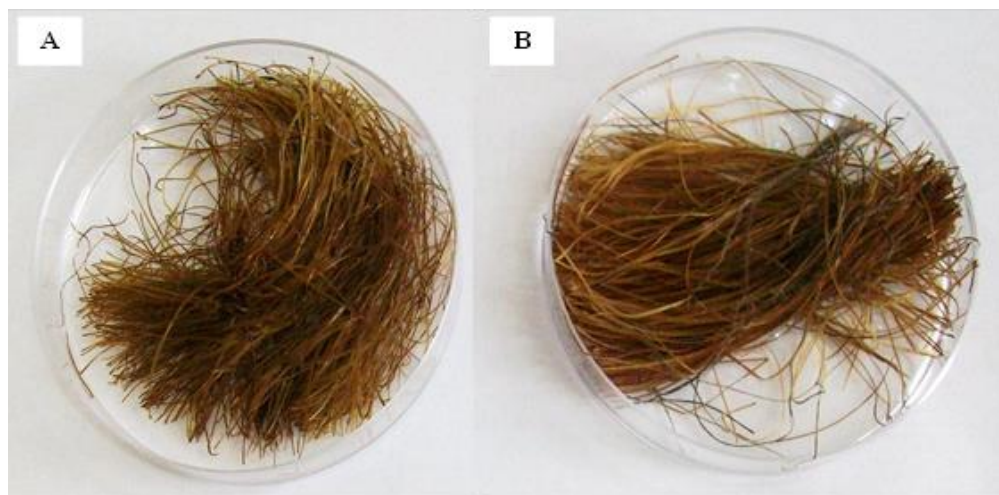


Figura 9: degradación de estigmas *in vitro* en la población SPF051. Se observan escasas diferencias de crecimiento tanto en el tratamiento inoculado de *Fusarium verticillioides* (B) como en el inoculado con agua (A).

Dado que los datos obtenidos para el carácter degradación de estigmas *in vitro*, cuantificada como biomasa remanente por gramo, se alejaron de los supuestos de normalidad necesarios para realizar los análisis de la variancia se transformó la variable mediante la transformación Box-Cox, descrita en el apartado II.8. El análisis de la varianza para este carácter luego de la transformación (Tabla 6) arrojó un R^2 de 0.7 con un coeficiente de variación de 34.29 %.

Del cuadro de análisis de la varianza se desprende que se pudieron evidenciar diferencias significativas entre los genotipos y entre los tratamientos, observándose una diferencia de 25% en la biomasa remanente en los tratamientos agua versus inoculado (Tablas 7 y 8).

Tabla 6: Coeficiente de variación y ajuste del modelo para el análisis de variancia para el carácter en estudio en la población de maíz utilizada en este trabajo. La tabla corresponde a los valores de la variable transformados mediante la transformación Box-Cox (III.8.).

Biomasa Remanente por gramo	300	0,7	0,28	34,29
------------------------------------	-----	-----	------	-------

Tabla 7: análisis de la varianza para el carácter degradación de estigmas *in vitro*, cuantificado como biomasa remanente por gramo en una población de mapeo de maíz (datos transformados mediante el método de Box-Cox).

Modelo.	9,04	172	0,05	1,69	0,0009
Genotipo	5,64	85	0,07	2,14	<0,0001
Tratamiento	1,71	1	1,71	55,03	<0,0001
Repetición	0,11	1	0,11	3,55	0,062
Genotipo*Tratamiento	1,58	85	0,02	0,6	0,9942
Error	3,94	127	0,03		
Total	12,98	299			

La tabla 8 muestra la diferencia entre los tratamientos realizados para los datos no transformados. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) y corresponden a cálculos hechos en base a los datos transformados. Los tratamientos (agua e inoculado) mostraron diferencias para el nivel de significancia evaluado.

Tabla 8: Medias para degradación de estigmas *in vitro* por gramo en la población de haploides duplicados de maíz utilizada en este estudio.

Inoculado	0,68	148
Agua	0,79	152

Medias seguidas por la misma letra no difieren a un nivel de probabilidad $p < 0,05$ de acuerdo a la prueba t

Los valores de coeficiente de variación como los de ajuste para el modelo indican que los resultados tienen una precisión aceptable para este estudio.

La interacción genotipo x tratamiento no fue significativa, indicando que los genotipos evaluados respondieron de la misma manera y en una magnitud similar a los tratamientos aplicados.

Existirían segregantes transgresivos para el carácter para ambos parentales (Figura 10), aunque las diferencias no fueron tan notorias entre los parentales de la población. Esto indicaría que hubo una degradación por parte de *F. verticillioides* en el parental moderadamente resistente más alta que la esperada en base a los resultados de Fauguel (2012) lo cual podría deberse al porcentaje de estigmas secos y a la presencia de flora nativa presente en la muestra inicial.

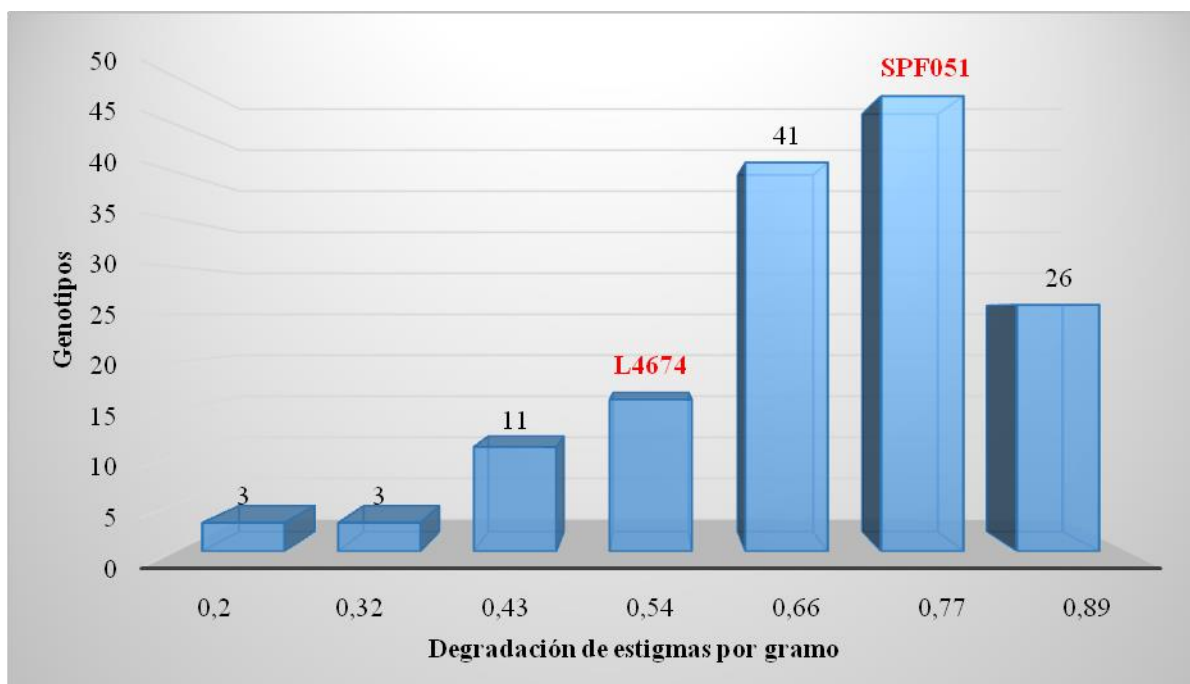


Figura 10: distribución de frecuencias de genotipos para biomasa remanente por gramo. Se indica el intervalo en el que se encuentra el parental L4674, así como el intervalo correspondiente a SPF051. En el eje de abscisas se indican las medias de porcentaje de estigmas abortados de los intervalos de frecuencias analizados y en las ordenadas, el número de genotipos que componen cada uno de los intervalos.

El tratamiento inoculado evidenció una menor proporción de biomasa remanente por gramo que el tratamiento con agua. Esto pudo haber afectado el mapeo de QTLs y cálculos de heredabilidad que serán referidos a estas condiciones experimentales y se recomienda repetir los experimentos a fin de lograr un mayor nivel de expresión de la variable.

La heredabilidad en sentido amplio, estimada en base a partir de las esperanzas de cuadrados medios de un análisis de variancia de la variable sin transformación previa que excluyó el tratamiento con agua (tabla 9) fue de 3,6E-05. La misma representa un valor de heredabilidad muy bajo para el carácter degradación de estigmas *in vitro* para este ensayo, lo cual dificultaría su utilización efectiva en programas de mejoramiento genético ya que la variación debida a los efectos ambientales sería la responsable de las diferencias observadas entre los genotipos.

Tabla 9: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I) para el tratamiento inoculado.

Modelo.	2,41	86	0,03	1,41	0,0803
Genotipo	2,35	85	0,03	1,39	0,0887
Repetición	0,06	1	0,06	2,91	0,0929
Error	1,22	61	0,02		
Total	3,63	147			

IV.2.3. Prueba de extracto

Todas las pruebas en las que se compararon los efectos sobre el crecimiento fúngico de tejidos de estigmas de SPF051 y L4674 con integridad física alterada dieron resultados no significativos. Estos resultados serían indicios de que no habría efectos de la bioquímica del estigma en la reacción observada en los genotipos a la infección por *Fusarium* y, por lo tanto, las diferencias observadas en el experimento anterior podrían deberse principalmente al efecto de barreras estructurales en los tejidos.

En la figura 11 se pueden observar las placas de los parentales a los cuales se les agregó el extracto de estigmas en el medio de cultivo utilizado, como se describió en la sección II.7.3. En las placas analizadas, no se observaron diferencias en cuanto a diámetro de colonia para el crecimiento de *F. verticillioides* para ninguno de los extractos utilizados y para ninguna de las concentraciones de hongo aplicadas.

Como resultado de esta experiencia se pudo observar, tanto en las placas inoculadas como en las placas control (sin el extracto) que el crecimiento de *F. verticillioides* fue normal y el desarrollo de las colonias no se vio afectado en ningún momento por la presencia del extracto de estigmas utilizado. Adicionalmente no se verificaron diferencias significativas entre los tratamientos o en las concentraciones de inóculo aplicadas para el nivel de significancia testeado.

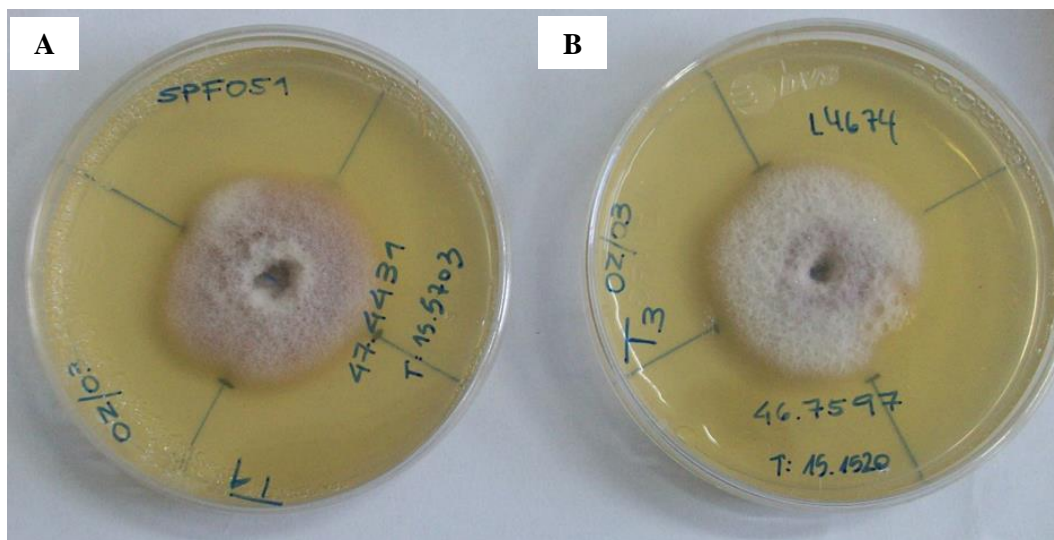


Figura 11: *Fusarium verticillioides* creciendo en el medio de cultivo agar papa glucosado con el agregado de los extracto de estigmas de los parentales SPF051 (A) y L4674 (B).

IV.2.4. Prueba de presencia de compuestos volátiles

Otra de las hipótesis planteadas respecto de la existencia de compuestos fungicidas o fungistáticos es que estos compuestos fueran volátiles.

Como resultado de esta experiencia, y al igual que para la prueba de extracto, no se observaron diferencias para el nivel de significancia probado, entre las placas analizadas. Concretamente, el crecimiento del hongo fue uniforme en todas las placas analizadas y no se vio afectado por ningún factor detectable.

IV.2.5. Análisis de la flora nativa presente

Dado que las muestras fueron procesadas y analizadas directamente luego de colectadas en el campo experimental, se diseñó un ensayo el cual tenía como finalidad evaluar la flora nativa presente en las muestras obtenidas. Esto permitiría comprobar la hipótesis de la presencia de algún microorganismo que pudiera modificar los resultados finales.

En la Figura 12 se observan, a modo de ejemplo, dos placas con muestras de grano tomadas al azar de la población en estudio, utilizadas para determinar el tipo de flora inicial presente en el campo. Se pudieron identificar hongos, tanto en estigma como en grano, del género *Fusarium* en forma prevalente de acuerdo lo reportado en trabajos anteriores para esta

zona de nuestro país (Chulzeet *al.*, 1996; Iglesiaset *al.*, 2010). Adicionalmente se vieron hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y levaduras, así como algunas colonias de bacterias. Dado el objetivo de este ensayo, que fue establecer el tipo de hongos presentes en la muestra inicial, la identificación a nivel de género fue adecuada para los fines perseguidos en el estudio.

La preexistencia de inóculo en la muestra inicial, en especial de *Fusarium*, podría explicar la poca diferenciación entre los tratamientos inoculado versus agua en cuanto a degradación de estigmas *in vitro*. La presencia de hongos en las muestras de estigmas a pesar de la decontaminación realizada podría haber interferido en los resultados finales de la investigación para este carácter y en el posterior mapeo y detección de QTLs.



Figura 12: Microflora nativa creciendo en el medio de cultivo Agar papa Glucosado a 25 °C.

IV.3. Construcción del mapa de ligamiento y Mapeo de QTLs

Uno de los objetivos iniciales al comenzar esta investigación fue la búsqueda de posibles genes o QTLs que estén relacionados a los caracteres estudiados. Inicialmente se contó con 384 marcadores SNPs obtenidos en colaboración con el programa de mejoramiento de maíz de la empresa Pioneer Argentina. Estos marcadores fueron corridos en la población de mapeo y en los parentales primeramente en busca de marcadores polimórficos entre los parentales que pudieran ser utilizados para la construcción de un mapa de ligamiento y posterior mapeo de QTLs.

IV.3.1 Análisis de la segregación de marcadores polimórficos

Se encontraron 82 marcadores polimórficos de los 384 analizados inicialmente. Esto dificultó inicialmente el estudio ya que redujo en un número considerable los marcadores disponibles a utilizar en mapeo. Esto constituye un porcentaje de polimorfismo de cerca del 21%, lo cual es muy bajo, explicado en parte por la variabilidad natural de la población SPF051.

Se analizaron las segregaciones de los marcadores, como requisito inicial para poder utilizarlos en el proceso de mapeo de QTLs. La Tabla 10 muestra el análisis de marcadores para la hipótesis de segregación 1:1 como se esperaría para una población de haploides duplicados.

De los 82 marcadores SNPs polimórficos encontrados, solo 44 presentaron la segregación esperada (Tabla 10). Los cromosomas que tuvieron un mayor número de marcadores polimórficos con segregación esperada fueron el cromosoma 6 y el 10, con 7 y 8 marcadores de segregación adecuada respectivamente (Tabla 11).

Tabla 10: Análisis de la segregación de marcadores polimórficos en una población de mapeo constituida por 88 haploides duplicados mediante prueba de Chi- cuadrado utilizando el software MapDisto.

N°	Marcador	Cromosoma	χ^2 1:1	p	Significancia	N°	Marcador	Cromosoma	χ^2 1:1	p	Significancia
1	2	1	33,78	0	*****	42	110	6	4,88	0,03	*
2	3	1	6,05	0,01	*	43	111	6	1,22	0,27	Ns
3	5	1	0,2	0,66	Ns	44	113	6	8,4	0,00	**
4	7	1	38,24	0	*****	45	114	6	3,12	0,08	Ns
5	12	1	10,98	0,00	***	46	115	6	0,33	0,56	Ns
6	15	1	25,63	0	*****	47	118	6	28,1	0	*****
7	16	1	0,31	0,58	Ns	48	119	6	0	1	Ns
8	17	1	2,39	0,12	Ns	49	120	6	0,05	0,83	Ns
9	18	1	25,8	0	*****	50	122	7	1,49	0,22	Ns
10	19	1	10,98	0,00	***	51	123	7	56,39	0	*****
11	20	1	15,8	0,00	*****	52	124	7	1,76	0,19	Ns
12	21	1	14,1	0,00	***	53	129	7	0,2	0,66	Ns
13	22	1	0,78	0,38	Ns	54	130	7	9,56	0,00	**
14	23	1	21,51	0	*****	55	133	7	41,02	0	*****
15	24	1	21,51	0	*****	56	134	7	25,8	0	*****
16	27	2	32,98	0	*****	57	136	7	17,61	0,00	****
17	29	2	1,76	0,19	Ns	58	137	7	0	1	Ns
18	31	2	12,49	0,00	***	59	144	8	0,2	0,66	Ns
19	32	2	0,78	0,38	Ns	60	145	8	0,44	0,51	Ns
20	33	2	74,2	0	*****	61	147	8	1,22	0,27	Ns
21	41	2	0,2	0,66	Ns	62	150	9	4,88	0,03	*
22	45	2	38,24	0	*****	63	152	9	9,56	0,00	**
23	46	2	35,56	0	*****	64	153	9	19,51	0,00	****
24	48	2	23,61	0	*****	65	154	9	16,06	0,00	****
25	49	2	3,28	0,07	Ns	66	159	9	2,39	0,12	Ns
26	54	3	0,01	0,91	Ns	67	161	9	0,05	0,83	Ns
27	56	3	0	1	Ns	68	162	10	0,44	0,51	Ns
28	59	3	3,12	0,08	Ns	69	163	10	0,62	0,43	Ns
29	60	3	59,76	0	*****	70	168	10	2,39	0,12	Ns
30	63	3	35,56	0	*****	71	169	10	49,95	0	*****
31	70	3	19,51	0,00	****	72	171	10	49,95	0	*****
32	73	3	63,22	0	*****	73	174	10	41,14	0	*****
33	76	3	53,12	0	*****	74	175	10	49	0	*****
34	78	4	3,95	0,05	*	75	178	10	2,39	0,12	Ns
35	87	4	49,95	0	*****	76	179	10	2,39	0,12	Ns
36	88	4	2,92	0,09	Ns	77	180	10	52,41	0	*****
37	89	4	4,46	0,03	*	78	182	10	0,05	0,83	Ns
38	90	4	0,78	0,38	Ns	79	183	10	5,13	0,02	*
39	99	5	59,76	0	*****	80	187	10	0,01	0,91	ns
40	106	5	0,05	0,83	Ns	81	190	10	38,24	0	*****
41	109	5	21,28	0	*****	82	191	10	30,49	0	*****

ns: no hay dif significativas con la segregación 1:1. *: hay diferencias al nivel $p < 0.1$. **:dif significativas para $p < 0.01$. ***:dif significativas para $p < 0.001$.****:dif significativas para $p < 0.0001$. *****: dif significativas para $p < 0.00001$

Tabla 11: Distribución de marcadores polimórficos con segregación esperada en los cromosomas de una población de mapeo de maíz.

1	5
2	4
3	3
4	4
5	1
6	7
7	5
8	3
9	4
10	8

IV.3.2 Construcción del mapa genético

A continuación, se hizo la construcción de un mapa genético que permita agrupar los marcadores obtenidos en los grupos de ligamiento correspondientes. Se analizaron 2 caracteres, los cuales fueron analizados en el presente estudio (porcentaje de estigmas abortados y degradación de estigmas) y que mostraron diferencias significativas entre los genotipos.

Se encontraron señales de QTLs solamente para el carácter porcentaje de estigmas abortados. Este carácter generó señales detectables en el análisis, lo que podría indicar la presencia de genes relacionados a las variaciones observadas en estas características. Las señales que se encontraron fueron localizadas en 4 cromosomas: 1; 2; 7 y 10.

Para el caso del cromosoma 1 (Figura 13) se observa que hay una señal significativa (superior al punto de corte elegido de $LOD = 3$) que indica una contribución positiva para el Porcentaje de estigmas abortados, con un R^2 de 19,1. Este resultado es importante porque estaría indicando la presencia de alguno/s genes que se relacionarían con el control de este carácter. Que la contribución sea positiva es un indicativo de que la contribución genética

proviene de SPF051, que es el genotipo que demuestra un valor de porcentaje de estigmas abortados más alto respecto del otro parental de la población de mapeo.

Los resultados observados en los cromosomas 2, 7 y 10, en los que se observó una señal significativa ($\text{LOD} > 2.5$), se muestran en las figuras 14, 15 y 16, respectivamente.

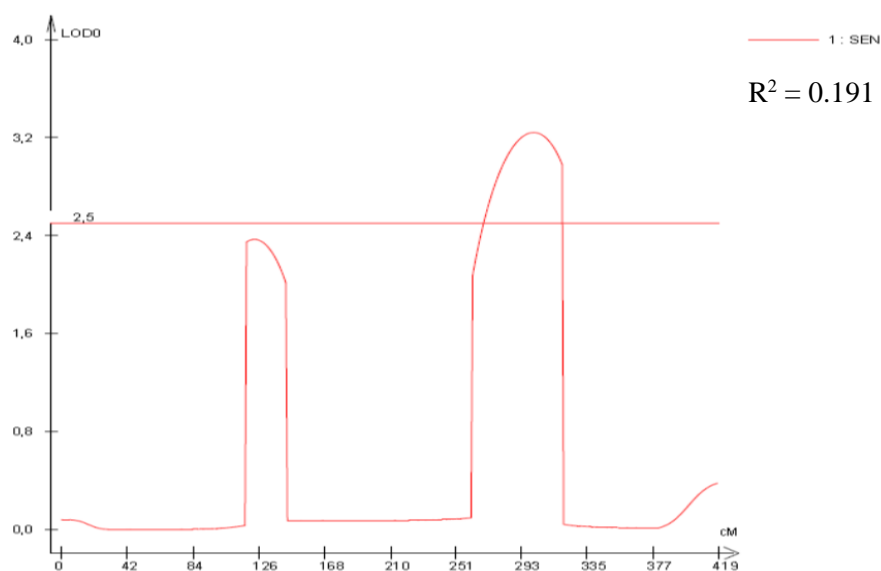


Figura 13: señales para el carácter porcentaje de estigmas abortados obtenidas por el método de Mapeo por Intervalo Compuesto, para el Cromosoma 1.

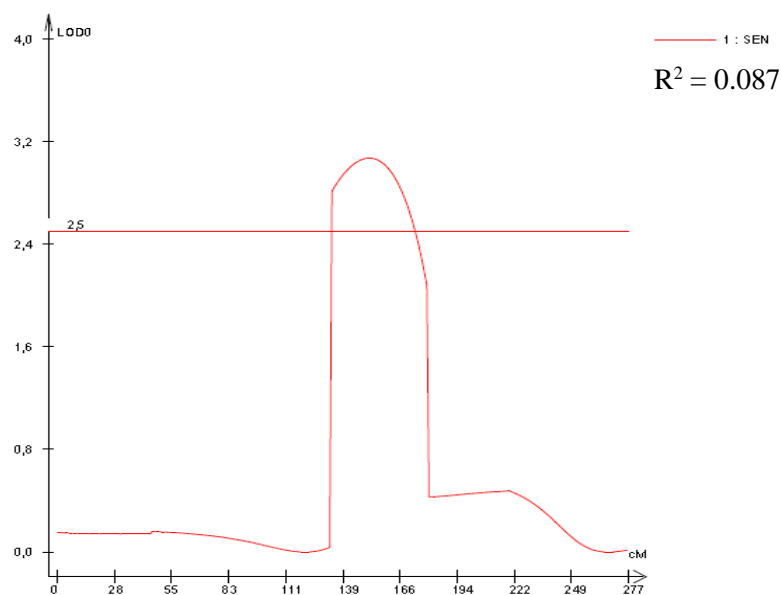


Figura 14: señales para el carácter porcentaje de estigmas abortados obtenidas por el método de Mapeo por Intervalo Compuesto, para el Cromosoma 2.

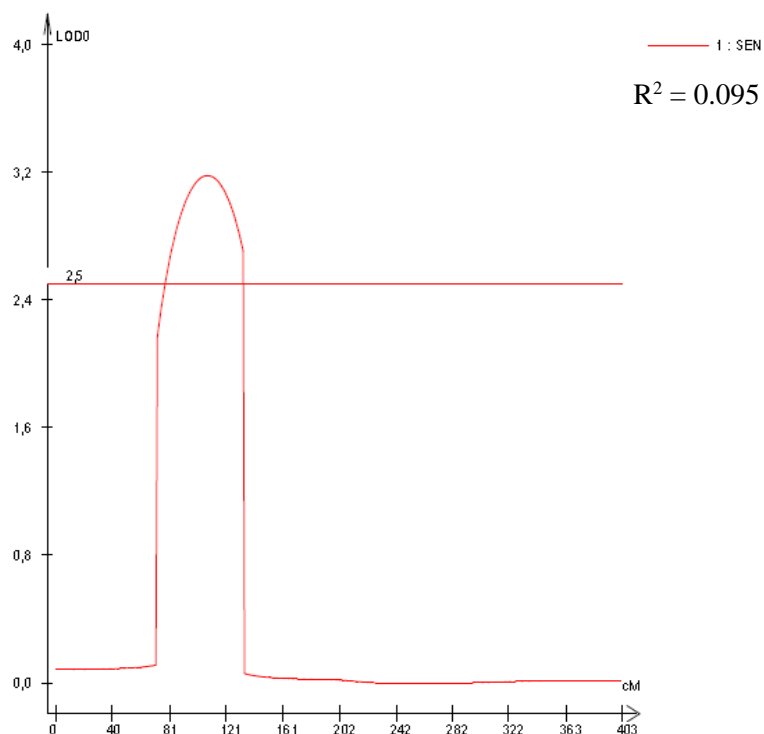


Figura 15: señales para el carácter porcentaje de estigmas abortados obtenidas por el método de Mapeo por Intervalo Compuesto, para el Cromosoma 7.

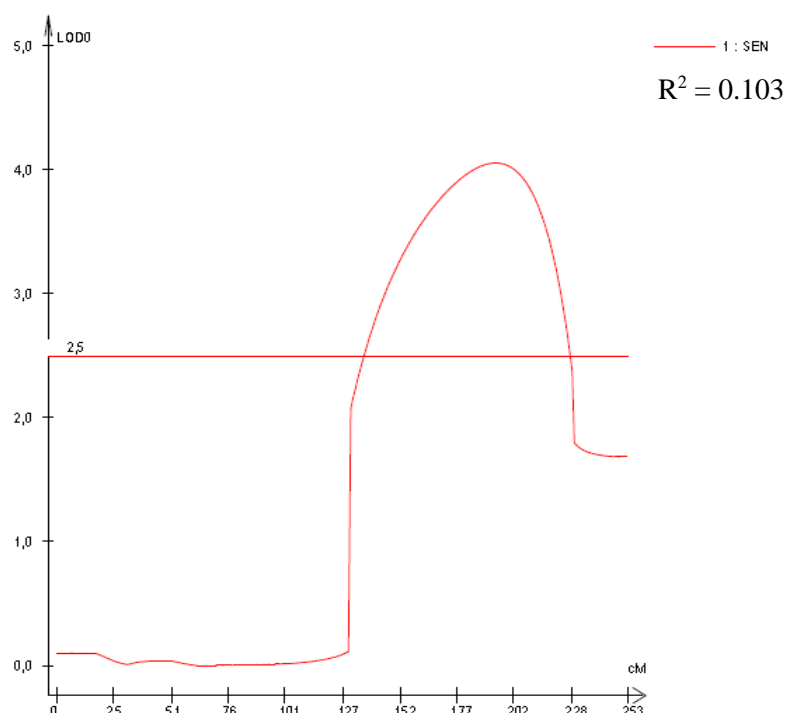


Figura 16: señales para el carácter porcentaje de e obtenidas estigmas abortados por el método de Mapeo por Intervalo Compuesto, para el Cromosoma 10.

Todas las contribuciones observadas para estos tres últimos casos fueron negativas, lo cual indica que la variación observada en estos casos correspondería a la contribución de L4674. Cabe destacar asimismo que la señal observada en el cromosoma 1 fue la de mayor magnitud en cuanto al porcentaje de la variación explicada (19.1%) mientras que las demás señales con contribución negativa fueron de menor intensidad.

En cuanto a degradación de estigmas *in vitro*, ninguna de las señales observadas fue significativa para el valor de corte esperado ($LOD > 2.5$). Esto es consistente con el cálculo previo de la heredabilidad de este carácter, que fue muy baja, indicando la dificultad de utilizar esta característica en un programa de selección asistida por marcadores moleculares en un programa de mejoramiento de maíz.

V. DISCUSIÓN

El objetivo de la presente investigación fue estudiar en detalle caracteres relacionados con la resistencia a *F. verticillioides* observada en la población SPF051 en estudios previos realizados en el programa de mejoramiento genético de maíz de INTA Pergamino (García *et al.*, 2014 y Fauguel, 2012). Esta población derivada de una colección nativa obtenida mediante presenta características especiales las cuales derivan en una mejor adaptabilidad ante la presión del patógeno mencionado.

V.I. Porcentaje de estigmas abortados

La entrada del patógeno a través de los estigmas se ha indicado como la principal vía de infección de *F. verticillioides* (Kohler, 1942). Una planta de maíz puede ensayar diversos mecanismos de defensa ante la colonización por patógenos. Estos mecanismos pueden ser de resistencia o bien de escape al ingreso del patógeno en cuestión.

Se han descripto diferentes mecanismos que podrían mediar en la resistencia observada en genotipos con buen comportamiento ante la infección por este tipo de patógenos. Como el agua disponible para el crecimiento fúngico juega un papel importante en el proceso de infección (Marín *et al.*, 1999) los maíces tardíos en los cuales la humedad del grano disminuye lentamente serían más susceptibles a la infección (Fandohan *et al.*, 2003). La cobertura completa de la espiga por parte de la chala (Enerson y Hunter, 1980) así como determinadas características del grano, como un pericarpio delgado (Hoenish y Davis, 1994) aumentan las chances de infección por *Fusarium*. Chalas muy ajustadas han sido descriptas como una característica desfavorable ya que retrasa la madurez de los granos aunque puede volverse favorable al considerar que protege la espiga de una mejor manera ante el ataque de insectos (Jeffers, 2004). Otros mecanismos indican que las características físicas y bioquímicas de los estigmas podrían estar relacionadas a la variabilidad observada en los genotipos. Previamente se ha reportado una gran correlación entre los niveles de contaminación con fumonisinas en grano y los factores que influyen en la infección vía estigmas, como la ventana de senescencia y la humedad de los mismos (Stewart *et al.*, 2002 y De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

La población de haploides duplicados obtenida a partir del cruzamiento de SPF051 y L4674 mostró una considerable variabilidad para el carácter porcentaje de estigmas abortados. El R^2 0.96 fue alto, indicando que el modelo propuesto fue adecuado para describir la respuesta de la población en cuanto al carácter en estudio.

De acuerdo al cuadro de análisis de la varianza puede verse que los parentales de la población evidenciaron diferencias significativas entre ellos, así como los genotipos que la componen, para el nivel de significancia analizado, teniendo SPF051 porcentajes de estigmas abortados de 91.96% promedio al día en el que se hizo la recolección de las muestras en el campo. Asimismo, las muestras de L4674 colectadas al mismo tiempo, mostraron porcentajes de estigmas abortados que se ubicaron en el grupo promedio de 36.4%, lo cual confirmó que el día de recolección fue adecuado para evidenciar las diferencias existentes entre estos genotipos para el carácter analizado. También se pudieron observar segregantes transgresivos, con valores inferiores al parental de menor valor, indicando que SPF051 podría tener alguna contribución a la disminución de estigmas abortados en la población. Este resultado se confirma posteriormente mediante los procedimientos de mapeo por intervalo compuesto aplicados a los datos fenotípicos y marcadores obtenidos. Se observan en los cromosomas 2, 7 y 10 señales que son significativas para el LOD propuesto pero que tienen una contribución negativa al carácter para la población considerada.

El porcentaje de estigmas abortados es una característica relativamente simple y rápida de medir. Evidenció una alta heredabilidad hacia los genotipos de la población (0.92) lo cual indica que podría utilizarse como herramienta de selección en un programa de mejoramiento de maíz.

En cuanto al análisis con marcadores moleculares, se pudieron detectar para este carácter 4 señales, de las cuales la localizada en el cromosoma 1 es la más importantes dado que tiene una contribución positiva a explicar la variación en el carácter, además de que explica un porcentaje importante (19.1%) de la variación observada.

No se puede soslayar el hecho de que el número de marcadores obtenidos que fueron adecuados para el análisis practicado fue de 44; esta cantidad de marcadores resulta insuficiente para poder confirmar la presencia de genes o QTLs que estén relacionados con la variabilidad encontrada en la población. Los resultados obtenidos en

este trabajo son principalmente un indicativo de situaciones posibles en cuanto a porcentaje de estigmas abortados, aunque se necesitan estudios adicionales, como la obtención de un número mayor de marcadores polimórficos con la segregación esperada, o un mapeo fino del cromosoma 1 o la construcción de poblaciones de mapeo adicionales a fin de tener la certeza de la presencia de QTLs en los cromosomas mencionados y que los mismos puedan ser utilizados en programas de selección asistida por marcadores.

V.2. Degradación de estigmas *in vitro*

Otro de los objetivos de este trabajo consistió en estudiar el efecto del hongo sobre los estigmas de los genotipos de la población de mapeo mediante estudios *in vitro* que modelen lo que ocurre en condiciones de campo. Se postuló que evaluando el comportamiento de los mismos ante la infección por *F. verticillioides* *in vitro*, se podrían obtener indicios de alguna estructura del estigma que esté colaborando en la resistencia observada, tanto de manera mecánica (estructura del estigma) como de manera bioquímica (compuestos químicos presentes en el estigma) como se publicó en trabajos anteriores (Fauguel, 2012).

La técnica de inoculación de los estigmas de la población de mapeo fue exitosa, ya que se pudo lograr desarrollo de micelio observable a simple vista. Los genotipos mostraron diferencias significativas entre ellos, para el nivel de significancia probado.

Las diferencias observadas entre los tratamientos fueron del 10%. Si bien el valor del tratamiento inoculado fue significativamente diferente al del tratamiento con agua (resultado obtenido mediante prueba estadística), las diferencias no fueron tan marcadas como las que se habían observado en experimentos anteriores (Fauguel, 2012), por lo que se infiere que las condiciones experimentales no permitieron evaluar en forma adecuada la variabilidad de la población de mapeo para este carácter. Una de las explicaciones que podría tener la poca diferencia entre los tratamientos es la presencia de inóculo proveniente del campo que pudo haberse llevado hasta el laboratorio, y que no pudo eliminarse totalmente mediante los tratamientos de decontaminación aplicados a las muestras previa inoculación e incubación. Como se reseñó previamente, las muestras provenientes del campo podrían haber tenido una importante carga previa de hongos, entre los cuales prevalecen los del género *Fusarium*, lo que está de acuerdo a

los reportes previos en el tema para la zona donde se realizó el ensayo (Chulzeet *al.*, 1996 y Iglesiaset *al.*, 2010).

La heredabilidad obtenida (tomando solamente en cuenta el tratamiento inoculado) fue de apenas 3,6E-05. Es una heredabilidad muy baja para un carácter que pretende ser utilizado en un programa de mejoramiento.

Se tuvo la dificultad adicional de tener que transformar los datos para ajustarlos a los supuestos del ANOVA, ya que los mismos se alejaban de la normalidad y la homogeneidad de varianzas, supuestos esperados para el desarrollo del análisis mencionado.

Para realizar el mapeo se utilizaron técnicas de análisis multivariado, a fin de obtener datos fenotípicos de mayor calidad e intentar mejorar las señales obtenidas. Sin embargo, la utilización de BLUPs de genotipo no mejoró las señales observadas, y se puede concluir que, para este estudio, ninguno de los cromosomas evidenció señales que superen el corte propuesto para el mapeo de QTLs. Este es un resultado esperable dada la baja heredabilidad del carácter mencionada previamente.

El método de inoculación *in vitro* de estigmas tiene varios puntos clave a tener en cuenta para el correcto desarrollo de la técnica: el momento del muestreo, la concentración del inóculo y el peso de los estigmas muestreados. Considerando estas variables, lo dificultoso de la medición de la cantidad de biomasa degradada y la heredabilidad muy baja calculada, los resultados indican que sería dificultoso utilizar este carácter para mejoramiento y desarrollo de nuevo germoplasma con características beneficiosas ante la presencia de inóculo de *F. verticillioides*.

V.3. Pruebas físicas/ bioquímicas de resistencia

Tanto la prueba de extracto como la de presencia de compuestos volátiles fueron realizadas para corroborar la posible presencia sustancias químicas que contribuyan a la resistencia. También se probó la influencia de la integridad física del estigma como primera barrera de entrada del patógeno. Estos mecanismos se describieron en anteriores trabajos para otros genotipos (Burow *et al.*, 1997; Fauguel, 2012; Ciccoritti *et al.*, 2014 y Giomi, 2015).

En el presente estudio no se pudo comprobar la presencia de compuestos bioquímicos presentes en el estigma, ni líquidos ni volátiles. La resistencia podría estar sostenida entonces por la integridad física del estigma, la cual actúa como primera barrera ante la entrada del patógeno. Dado que *F. verticillioides*, así como otros patógenos de planta, no produce estructuras de penetración que le permitan evitar estas barreras, las mismas cobran una importancia fundamental para la resistencia observada en los genotipos en estudio.

Se pudieron alcanzar los objetivos planteados al comienzo de esta investigación. Se estableció la utilidad del carácter porcentaje de estigmas abortados, como un buen descriptor de la aptitud observada en SPF051 al ataque por patógenos de espiga, en especial por *F. verticillioides*. El mecanismo de senescencia aumentada le daría un “escape” a la ventana de mayor presencia de inóculo del hongo (entre el día 4 y 7 posterior a la floración femenina). Esto disminuiría considerablemente la prevalencia de la enfermedad en los genotipos con estas características.

El porcentaje de estigmas abortados es un carácter simple, fácil de medir y con una alta heredabilidad. Los estudios de mapeo de QTLs son prometedores, aunque no se agotan con esta investigación. Son necesarios más ambientes, más marcadores y más años de prueba para tener la certeza de que es un carácter útil para un programa de mejoramiento genético. Los resultados obtenidos en este trabajo son apenas una contribución inicial en el estudio de la reacción a *F. verticillioides* en SPF051.

Por el contrario, encontramos que la degradación de estigmas *in vitro* es una característica dificultosa de medir y evaluar, además de presentar baja heredabilidad. No encontramos señales significativas de la presencia de genes que pudieran estar

relacionados con la variación observada. Posiblemente la integridad de los estigmas sea importante y la primera barrera a la entrada del patógeno a la planta. Se necesitan estudios adicionales de esta característica que permitan mejorar la eficiencia en la medición y explicar este aspecto de la resistencia de SPF051 en mayor detalle.

Posteriores estudios, con un mayor número de marcadores adecuados y más ambientes analizados podrán definir si el principal componente del buen comportamiento ante la infección por *F. verticillioides* es la tasa de aborto de estigmas aumentada de SPF051 y las características físicas de sus estigmas como surge de este estudio, o si existe algún mecanismo adicional que explique la importante variación observada en esta población de mapeo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C. (2001). Association of *Fusarium* mycotoxicosis with failure in applying an induction of parturition program with PGF2 alpha and oxytocin in sows. *Theriogenology*, 55(8): 1745-1757.
- Asplin, F.D. y Carnaghan, R.B.A. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, 73: 1215-1219.
- Bacon, C.W.; Porter, J.K.; Norred, W.P. y Leslie, J.F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4039-4043.
- Bartók T.; Szécsi A.; Szekeres A.; Mesterházy A. y Bartók M. (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(16): 2447-62.
- Basten, C.J.; Weir, B.S. y Zeng, Z.B. (2004). QTL Cartographer, version 1.17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Beadley, G.W. (1939). Teosinte and the origin of maize. *Journal of Heredity*, 30: 245-247.
- Beadley, G.W. (1978). Teosinte and the origin of maize. In: Maize breeding and genetics; Walden D.B. (ed), pp 113-128. New York, NY, USA.
- Beadley, G.W. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American*, 242: 112-119.
- Bergvinson, D.J. y Reid L.M. (1995). Phytochemical mechanisms of resistance to ear rots. *Maize genetics cooperation newsletter*, 69: 114-114.
- Bily, A.C.; Reid, L.M.; Taylor, J.H.; Johnston, D.; Malouin, C.; Burt, A.J. y Philogene, B.J.R. (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93(6): 712-719.
- Blount, W.P.; Fraser, D.M.; Knight, D. y Dowling, W.M. (1963). The use of ducklings for the detection of aflatoxin. *Veterinary Record*, 75: 35.
- Buchaca, M.B. (2011). Susceptibilidad a *Fusarium verticillioides*, *Gibberella zeae* y *Diplodia maydis* en líneas e híbridos pre-comerciales de maíces templados y tropicales. Trabajo final Especialización en Mejoramiento Genético Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

- Burow, G.B.; Nesbitt, T.C.; Dunlap, J. y Keller, N.P. (1997). Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(3): 380-387.
- Chulze, S.N.; Ramirez, M.L.; Farnochi, M.C.; Pascale, M.; Visconti, A. y March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9): 2797-2801.
- Ciba-Geigy Agrochemicals Technical Monograph-CIBA-GEIGY. (1979).
- Ciccoritti, R.; Pasquini, M.; Sgrulletta, D. y Nocente, F. (2014). Effect of 5-n-alkylresorcinol extracts from durum wheat whole grain on the growth of *Fusarium* head blight (FHB) causal agents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(1): 43-50.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Task Force Report N°139, Ames, Iowa, USA.
- De la Torre-Hernández, M.E.; Sánchez-Rangel, D.; Galeana-Sánchez, E. y Plasencia De la Parra, J. (2014). Fumonisin-Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1): 77-91.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Ding J.Q.; Wang X.M.; Chander S.; Yan J.B. y Li J.S. (2008). QTL mapping of resistance to *Fusarium* ear rot using a RIL population in maize. *Molecular Breeding*, 22: 395-403.
- Dowd, P.F. (1998). Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*; Sinha, K.K. and Bhatnagar, D. (eds), pp 307-350. Marcel Dekker, New York.
- Duvick J.P. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental health perspectives*, 109(2): 337-342.
- Enerson, P.M. y Hunter, R.B. (1980). Response of maize hybrids to artificially inoculated ear mould incited by *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Science*, 60: 1463-1465.

- Eyherabide, G.H. (2006). Mejoramiento genético de maíz y su trayectoria en la Argentina. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, Volumen II: Maíz y Nutrición, 14.
- Fan, J.B; Oliphant, A.; Shen R.; Kermani, B.G.; Garcia, F.; Gunderson, K.L.; Hansen, M.; Steemers, F.; Butler, S.L; Deloukas, P.; Galver, L.; Hunt, S.; McBride, C.; Bibikova, M.M.; Rubano, T.; Chen, J.; Wickham, E.; Doucet, D.; Chang, W.; Campbell, D.; Zhang, B.; Kruglyak, S.; Bentley, D.; Haas, J.; Rigault, P.; Zhou, L.; Stuelcpnagel, J. y Chee, M.S. (2003). Highly parallel SNP genotyping. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Vol. 68. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Falconer, D. S. (1996). Introduction to quantitative genetics. N. 575.1 F182I. Acribia.
- Fandohan, P.; Hell, K.; Marasas, W.F.O. y Wingfield, M.J. (2003). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology*, 2: 570-579.
- Fauguel C.M. (2012). Bases bioquímicas de la resistencia a *Fusarium verticillioides* en germoplasma Argentino de maíz. Caracterización de fracciones proteicas y compuestos volátiles. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2004). Food and Feeds in 2003. Food and Nutrition Paper 81. FAO Organization of the United Nations, Roma.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2013). En: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins>.
- García, G.; Fauguel, C.; Giomi, G.; Campos Bermúdez, V.; Iglesias, J.; Fernandez, M.; Sampietro, D.; Oviedo, S.; Benedit, P. y Presello, D. (2014). Desarrollo de resistencia genética a hongos toxicogénicos en germoplasma de maíz argentino. X Congreso Nacional de Maíz, INTA Pergamino, Buenos Aires.
- Giomi, G. (2015). Mapeo de QTLs asociados a componentes de resistencia a *Fusarium* spp. en grano de maíz. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Agrarias y Naturales, Universidad Nacional de Rosario.
- Giorda, L. y Peiretti, D. (2006). Respuesta de germoplasma de maíz a infecciones por *Fusarium verticillioides* y contaminación con fumonisinas. In: Micotoxinas:

- Impacto en la producción y salud humana y animal, Cap.5; Rubinstein, H.R. (ed), pp 125-138. Universidad Nacional de Córdoba.
- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3): 213-240.
- Harrison, L.R.; Colvin, B.M.; Greene, J.T.; Newman, L.E. y Cole, J.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(3): 217-221.
- Headrick, J.M. y Pataky J.K. (1991). Maternal influence of the resistance of sweet corn lines to kernels infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 81(3): 268-274.
- Hesseltine, C.W. y Bothast, R.J. (1977). Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. *Mycologia*, 69: 328-340.
- Hoenish, R.W. y Davis, R.M. (1994). Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in fieldcorn. *Plant Disease Journal*, 78: 517-519.
- IARC. International Agency for Research on Cancer (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. (Vol. 84) Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Iglesias, J.; Presello, D.A.; Botta, G.L.; Lori, G.A. y Eyherabide, G.H. (2005). Agresividad de aislamientos de *Fusarium verticillioides* en maíz. Congreso Nacional de Maíz, Rosario, Santa Fe.
- Iglesias, J.; Presello, D.A.; Botta, G.; Lori, G.A. y Fauguel, C.M. (2010). Aggressiveness of *Fusarium* Section Liseola isolates causing maize ear rot in Argentina. *Journal of plant pathology*, 92(1): 205-211.
- Jeffers, D.P. (2004). Disease control. In Corn: Origin, History, Technology, and Production; Smith, C.W. (ed), pp 669-716. NewYork.
- Jones, C.; Ciacci-Zanella, J.R.; Zhang, Y.; Henderson, G. y Dickman, M. (2001). Analysis of fumonisin B1-induced apoptosis. *Environmental health perspectives*, 109(2): 315.
- Kohler, B. (1942). Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *Journal of Agricultural Research*, 64(8): 421-442.

- Kosambi, D.D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12(1): 172-175.
- Longley, A.E. (1941). Chromosome morphology in maize and its relatives. *The Botanical Review*, 7(5): 263-289.
- Lorieux, M. (2012). MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, 30(2): 1231-1235.
- Magan, N. y Aldred, D. (2007). Why do fungi produce mycotoxins?. In: *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*; Dijksterhuis J., Samson R.A. (ed); pp. 121–133. Taylor y Francis; Boca Raton, FL, USA,
- Maiorano, A.; Reyneri, A.; Sacco, D.; Magni, A. y Ramponi, C. (2009). A dynamic risk assessment model (FUMAgain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection*, 28(3): 243-256.
- Maizar. (2013). La Cadena del maíz y las oportunidades para el desarrollo en la Argentina. Consultoría elaborada por encargo del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Mangelsdorf, P.C. (1974). Corn: Its Origin, Evolution, and Improvement. *Harvard University Press*, Cambridge, Massachusetts.
- Marín, S.; Magan, N.; Belli N., N.; Ramos, A.J.; Canela, R. y Sanchos, V. (1999). Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3): 159-167.
- Martin C.J. (2011). Development of sequence-specific molecular markers based on phenylpropanoid pathway genes for resistance to *Fusarium Graminearum* (Schwabe) in Zea Mays(L.) Thesis from University of Guelph, Ontario, Canada.
- Martínez, M.C.; Moschini R.; Barreto D.; Bodega J.; Comerio R.; Forjan H.; Piatti F.; Presello D.A. y Valentinuz O. (2010a). Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisinas en granos de maíz. *Tropical Plant Pathology*, 35: 277-284.
- Martínez M.C.; Helguera M. y Carrera A. (2010b). Marcadores Moleculares. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, Ediciones INTA, Fundación ARGENBIO; Levitus y col. (eds), pp 80-84.

- Miller (1991). Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. *Fungi and Mycotoxins in Soted Product*. Aciar Proceedings N. 36, pp: 126-135.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). (2015). Disponible en: www.minagri.gob.ar.
- Munkvold, G.P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*, 109: 705-713.
- Munkvold, G.P.; Hellmich, R.L.; Showers, W.B. (1997). Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87:1071-1077.
- Munkvold, G. P. y Carlton, W. M. (1997). Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Disease*, 81(2), 211-216.
- Munkvold, G.P. y Desjardins, A.E. (1997). Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant disease*, 81(6): 556-565.
- Nelson, P.E.; Plattner, R.D.; Shackelford, D.D. y Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3): 984-989.
- Oren, L.; Ezrati, S.; Cohen, D. y Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3): 1695-1701.
- Paliwal, R.L.; Granados, G.; Lafitte, H.R.; Violic, A.D. y Marathée, J.P. (2001). Elmaíz en los trópicos: Mejoramiento y producción *Food and Agriculture Organization*. (No. 28).
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A. y Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9): 754-766.
- Pérez-Brito D.; Jeffers D.; González-de-León D.; Khairallah M., Cortés-Cruz M.; Velázquez-Cardelas G.; Azpíroz-Rivero S. y Srinivasan G. (2001). QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in Highland maize, México. *Agrociencia*, 35: 181-196
- Reid, L.M.; Woldemariam, T.; Zhu, X.; Stewart, D.W. y Schaafsma, A.W. (2002). Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium*

- graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. *Canadian journal of plant pathology*, 24(2): 162-167.
- Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *International journal of food microbiology*, 119(1): 3-10.
- Robertson-Hoyt L.A.; Jines M.P.; Balint-Kurti P.J.; Kleinschmidt C.E.; White D.G.; Payne G.A.; Maragos C.; Molnár T.L. y Holland J.B. (2006). QTL mapping for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*, 46: 1734-1743
- Sampietro, D.A.; Marín, P.; Iglesias, J.; Presello, D.A.; Vattuone, M.A.; Catalan, C.A.N. y Jaen, M.G. (2010). A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*, 114(1): 74-81.
- Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A.; Presello, D.A.; Fauguel, C.M. y Catalán, C.A.N. (2009). The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*, 28(2): 196-200.
- Sax, K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8(6): 552-560.
- Shelby, R.A.; White, D.G. y Bauske, E.M. (1994). Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Disease*, 78: 582-584.
- Smith, J.E. y Moss, M.O. (1985). *Mycotoxin: Formation, analysis and significance*. John Wiley, pp 148.
- Stewart, D.W.; Reid, L.M.; Nicol, R.W. y Schaafsma, A.W. (2002). A mathematical simulation of growth of *Fusarium* in maize ears after artificial inoculation. *Phytopathology*, 92(5): 534-541.
- Tanaka, A. y Yamaguchi, J. (1972). Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. *Journal of the Faculty of Agriculture*. 57: 71-132.
- Tanksley, S.D. (1993). Mapping polygenes. *Annual review of genetics*, 27(1): 205-233.
- Valdivia, E.R.; Cosgrove, D.J. y Stephenson, A.G. (2006). Role of accelerated style senescence in pathogen defense. *American journal of botany*, 93(11): 1725-1729.
- Wang, E.; Ross, P.F.; Wilson, T.M.; Riley, R.T. y Merrill Jr, A.H. (1992). Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in

- ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Nutrition*, 122(8): 1706-1716.
- Weatherwax, P. (1955). History and origin of corn. I. Early history of corn and theories as to its origin. In: *Corn and corn improvement, 1st ed.*; Sprague G.F. (ed), pp 1-16. New York, NY, USA, Academic Press.
- White, D. (1999). Fusarium Kernel or Ear Rot. In: *Compendium of Corn Diseases*; White D. (ed). St. Paul: American Phytopathological Society.
- Wilson, J.; Otsuki, T. y Sewadeh, M. (2001). Saving two in a billion: quantifying the trade effect of European food safety standards on African exports. *Food policy*, 26(5): 495-514.
- Yates, I.E. y Jaworski, A.J. (2000). Differential growth of *Fusarium moniliforme* relative to tissues from 'Silver Queen' a sweet maize. *Canadian Journal of Botany*, 78(4): 472-480.